

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

**Spektralanalytische Befunde zur
Wechselwirkung von Pyridinderivaten
mit dem Cytochrom P-450**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Hans Georg Jonen
aus Hamburg

Mainz 1973

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

**Spektralanalytische Befunde zur
Wechselwirkung von Pyridinderivaten
mit dem Cytochrom P-450**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Hans Georg Jonen
aus Hamburg

Mainz 1973



Fachbereichsdekan: Professor Dr. U. Wollert
Referent: Professor Dr. G. F. Kahl
Korreferent: Professor Dr. K. J. Netter

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 6. 1973

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
Ziel der Arbeit	20
METHODEN	22
1. Herstellung der Mikrosomenfraktion	22
a) Vorbehandlung	22
b) Aufbereitung	22
c) Eiweißbestimmung	23
2. Spektralanalytische Untersuchungen	23
a) Technische Verfahrensweisen	23
b) Durchführung	24
3. Chemikalien	25
4. Statistische Auswertung	26
ERGEBNISSE	27
1. Verschiedene Einflußmöglichkeiten auf die Bildung des Absorptionsmaximums bei 446 nm	27
a) Das metyraponbedingte Absorptionsmaximum bei 446 nm unter verschiedener Vorbehandlung	27
b) Entstehung eines Absorptionsmaximums bei 446 nm unter Pyridin und verschiedenen Pyridinderivaten	30
c) pH-Abhängigkeit des Verhältnisses des Absorptionsmaximums bei 446 nm zum Absorptions- maximum bei ca. 425 nm im durch 3-(3-Pyridyl)- propanol hervorgerufenen Spektrum	32
d) Bildung des Absorptionsmaximums bei 450 nm aus dem Absorptionsmaximum bei 446 nm durch sukzessive Zugabe CO-gesättigten Puffers	33
2. Vergleichende Untersuchungen auf ähnliches Verhalten von Metyrapon und einigen Pyridinen	34
a) Stoffwechselhemmende Wirkung	34
b) Bildung von Pyridinhämochromogenspektren	36
DISKUSSION	37
1. Ein oder zwei Cytochrome ?	37
a) Extinktionskoeffizienten des CO-Komplexes des reduzierten Cytochrom P-450 nach PB- und 3-MC-Stimulierung	38
b) "P-446" und "P-454"	40
c) pH-Abhängigkeit der zweigipfligen Soret-Banden	42
2. Korrelation zwischen Bindungs-, Michaelis- und Hemmkonstanten	43
ZUSAMMENFASSUNG	46
LITERATURVERZEICHNIS	48

Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Nach Applikation eines Arzneimittels verfügt der menschliche Körper über verschiedenartige Möglichkeiten der Elimination. Die meisten Arzneimittel erfahren sowohl eine Veränderung ihres Moleküls als auch die Verbindung mit einem körpereigenen Metaboliten. Häufig folgt der nicht-synthetischen Veränderung ein synthetischer Reaktionsschritt. Biotransformationen nicht-synthetischer Art verlaufen als Oxydation, Reduktion oder Hydrolyse. Ungeachtet einer Wertung dieser Reaktionen als Giftung, Entgiftung oder Neugewinn pharmakologischer Wirksamkeit scheint das Prinzip dieser Umwandlungen eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit und damit Ausscheidungsfähigkeit der meist lipophilen Arzneimittel zu sein. Während die wasserlöslichen Substanzen durch unspezifische Oxydasen, Peroxydasen und Dehydrogenasen oxydiert werden können, steht für den Abbau vieler lipophiler Verbindungen

Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen:

MP =Metyrapon

PB =Phenobarbital

3-MC =3-Methylcholanthren

EtNC =Äthylisocyanid

3-MMAB =3-Methyl-4-methylaminoazobenzol

CO =Kohlenmonoxid

EDTA =Äthylendiamintetraacetat

ACTH =adrenocorticotropes Hormon

RNA, RNS =Ribonucleinsäure

NADP, NADP⁺ =Nicotinamidadenindinucleotidphosphat

NADPH =reduziertes NADP

NAD, NAD⁺ =Nicotinamidadenindinucleotid

NADH =reduziertes NAD

K_M =Michaeliskonstante

K_S =Substratkonstante, spektrale Dissoziationskonstante

K_I =Inhibitorkonstante

ein besonderes Enzymsystem zur Verfügung, welches im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle lokalisiert ist. Es handelt sich hierbei um ein System von Membranen, die man sich räumlich in Gestalt eines Gitterwerkes aus hohlen, gefensterten Platten vorzustellen hat, die durch kurze Querverbindungen kommunizieren (Bargmann, 1964). Diese Membranen besitzen zum Teil eine raue Oberfläche (rough surface), die mit Ribosomen besetzt ist und zur Synthese von Protein und Fett befähigt ist (Claude, 1938). Von diesem rauhen Kompartiment läßt sich ein glattes (smooth surface) unterscheiden, welches den Hauptanteil der arzneimittelabbauenden Enzyme stellt. Mit Hilfe der Dichte-Gradienten-Zentrifugation gelingt es, weitere Unterscheidungen in Subfraktionen wie "smooth I" und "smooth II" vorzunehmen, die unterschiedliche enzymatische Aktivitäten aufzeigen (Glaumann, 1970).

Das präparatorische Korrelat dieses Membransystems stellen die Mikrosomen dar (Claude, 1938; Palade, 1956). Sie werden durch Ultrazentrifugation gewonnen und stellen sich im Elektronenmikroskop als Bläschen und Körnchen mit einem Durchmesser von 100-300 m μ dar (Bargmann, 1964). Diese Zellfragmente aus Lipid, Protein, Häm und RNS sind hauptsächlich zur Oxydation, aber auch zur Hydrolyse und Reduktion von Fremdstoffen befähigt (Brodie et al., 1953; Mitoma und Udenfriend, 1955).

Als oxydative Abbauege sind folgende Reaktionen möglich:

1. Oxydation von Alkylketten, z.B. die Seitenkettenoxydation von Hexobarbital (Brodie et al., 1958).

2. Oxydation von aromatischen Ringen, z.B. Acetanilid - p-Hydroxyacetanilid (Brodie und Axelrod, 1948).

3. Oxydative Desalkylierung als O-Desalkylierung, z.B. Codein - Morphin (Axelrod, 1955; Mannering et al., 1954); p-Nitroanisol - p-Nitrophenol (Netter, 1960) oder als N-Desalkylierung, z.B. Amidopyrin - 4-Amino-Antipyrin (Pechthold, 1964).

4. N-Oxydation, z.B. N,N-Dimethylanilin - N,N-Dimethylanilin-N-Oxid (Uehleke et al., 1971).

5. Sulfoxydation, z.B. Clorpromazin - Chlorpromazin-sulfoxid (Gillette und Kamm, 1960).

Von dem mikrosomalen Enzymsystem katalysiert, benötigen diese Prozesse Sauerstoff und NADPH (Axelrod, 1955; Mitoma et al., 1956; Gillette et al., 1957; La Du et al., 1955). Für diese Reduktion von Enzymen mit zwei verschiedenen katalytischen Aktivitäten: Reduktion eines Atoms eines Sauerstoffmoleküls, gekoppelt mit einer spezifischen Oxydation oder Hydroxylierung mit Hilfe des anderen Atoms - hat Mason 1957 den Begriff der mischfunktionellen Oxydation bzw. "mixed function oxydation" geprägt. In einer allgemeinen Gleichung dargestellt lautet dieser Vorgang:



Ein Atom des molekularen Sauerstoffs, der aus der Atmosphäre stammt (Hayaishi et al., 1956; Posner et al., 1961), wird also in den Akzeptor (A) eingebaut, während das andere Atom Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Trotz der Strukturvielfalt der Akzeptormoleküle werden diese Prozesse durch ein Enzymsystem vermittelt, dessen Arbeitsweise der mitochondrialen Atmungskette vergleichbar ist. Das Schlüsselenzym dieses Systems - analog dem Warburg'schen Atmungsferment - ist das Cytochrom P-450, welches einerseits als Endoxydase fungiert und damit als der sauerstoffaktivierende Faktor angesehen wird (Cooper et al., 1965; Omura et al., 1965), andererseits aber auch die Substratbindung übernimmt (Imai und Sato, 1966, a; Remmer et al., 1966). Das Cytochrom P-450 tritt durch die gesamte phylogenetische Skala hindurch auf; es ist aber erst in höheren Organismen fest an Membranen gebunden (Yong et al., 1970), was zur Bezeichnung Retikulochrom Anlaß gegeben hat (Omura und Sato, 1964, c). Dieser Umstand erschwert jedoch die Isolierung des Cytochroms aus Mikrosomen und Mitochondrien; denn nach Membranlösung verliert das Pigment seine Aktivität.

In reduziertem Zustand bildet das Cytochrom P-450 einen Komplex, mit Kohlenmonoxid (Omura und Sato, 1964, a). Das wiederum hat seine Entdeckung als "CO-bindendes Pigment" begründet (Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958), bevor seine

enzymatische Funktion bekannt war. Die starke Absorption dieses Komplexes bei 450 nm führte zur leichten Identifizierung (Estabrook et al., 1963) und damit auch zum Namen "Cytochrom P-450" (Omura und Sato, 1962). An CO gebunden ist das Cytochrom nicht mehr funktionsfähig. So konnte gezeigt werden, daß CO die Hydroxylierung vieler Pharmaka und Steroide durch Leber- oder Nebennierenrindenenzyme (Estabrook et al., 1963) durch Bindung an Cytochrom P-450 hemmt. Durch monochromatisches Licht der Wellenlänge 450 nm läßt sich die Bindung wieder aufheben, und das Cytochrom gewinnt seine enzymatische Aktivität zurück (Cooper et al., 1965). Dieser Vorgang der Photodissoziation läßt sich auch direkt erfassen (Omura et al., 1965). Zu den stoffwechselwirksamen Eigenschaften der Endoxydase gehören neben der Hydroxylierung körpereigener Substanzen, wie zum Beispiel der von Steroiden in den Mitochondrien der Nebennierenrinde (Estabrook et al., 1963) und der von Arzneimitteln und anderen Fremdstoffen in Lebermikrosomen auch die Lipidperoxydation (Orrenius et al., 1964) und die ω -Oxydation von Fettsäuren (Wada et al., 1968; Das et al., 1968).

Neben dem Cytochrom P-450 enthalten die Mikrosomen ein weiteres Hämoprotein, das auch dem b-Typ angehört (Strittmatter und Ball, 1954). Dieses "Cytochrom b_5 " kann ebenfalls über das mikrosomale Elektronentransportsystem reduziert werden. Ihm vorgeschaltet ist ein Flavoprotein, die von Strittmatter isolierte NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase (Strittmatter, 1958). Die Mikrosomen enthalten noch ein weiteres Flavoprotein, welches die Fähigkeit besitzt, oxydiertes Cytochrom c durch NADPH zu reduzieren, und NADPH-Cytochrom c-Reduktase genannt wird. Das Enzym wurde als lipase-gelöste (Williams und Kamin, 1962) und trypsin-gelöste Reduktase (Phillips und Langdon, 1962) gereinigt und isoliert. Es ist wahrscheinlich dem von Strittmatter isolierten Flavoprotein vergleichbar. Es besteht allerdings noch eine mangelnde Übereinstimmung der kinetischen Konstanten des Flavoproteins in seiner gereinigten, isolierten Form und

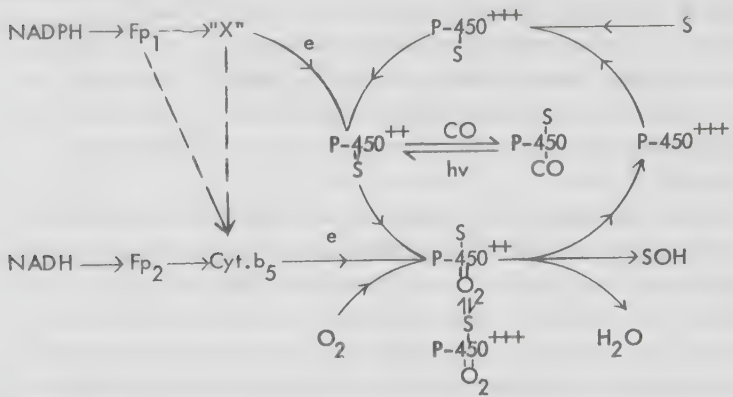
als membrangebundener Enzymkomplex (Cohen und Estabrook, 1971,a). Unwidersprochen bleibt jedoch die Beteiligung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase an der mischfunktionellen Oxydation (Omura, 1969). Mit einer höheren K_M kann diese Reduktase auch durch NADH reduziert werden (Ichikawa et al., 1969), so wie auch die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase vom NADPH Elektronen aufnehmen kann (Cohen und Estabrook, 1971,a).

Ein bisher unbekanntes Zwischenglied "X" wird weiterhin in dem System der NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase vermutet (Dallner et al., 1966). Dieses Enzym enthält wie die Cytochrome Eisen, welches jedoch nicht in einem Häm-Molekül gebunden ist. Versuche mit einem aus der Nebennierenrinde isolierten "non-heme-iron (NHI) -protein" zeigen dessen Wirksamkeit sowohl für die 11- β -Steroid-Hydroxylase-Aktivität als auch einen stark beschleunigenden Einfluß auf die Cytochrom P-450-Reduktion (Omura et al., 1965). Die Bedeutung eines weiteren Faktors, des cyanidbindenden Proteins, für die mischfunktionelle Oxydation wird noch erörtert (Gaylor et al., 1970; Oshino et al., 1966).

Da nach Waterman und Mason (1970) und Peterson (1971) das Cytochrom P-450 nur als 1-Elektron-Akzeptor fungieren kann, andererseits aber zwischen dem Substrat und dem molekularen Sauerstoff ein 2-Elektronen-Reduktionsmittel gleicher Wertigkeit zu fordern ist (Mason, 1957), ist die Frage nach dem zweiten Elektronendonator allein mit der Elektronentransportkette: NADPH - NADPH-Cytochrom c-Reduktase - "X" - Cytochrom P-450 nicht beantwortet. Es sind kooperative Interaktionen zwischen NADH und NADPH ohne Vermittlung mikrosomaler Transhydrogenasen (Cohen und Estabrook, 1971,b) und die Beteiligung von Cytochrom b_5 an der mischfunktionellen Oxydation (Hildebrandt und Estabrook, 1971) denkbar. Ein mögliches Elektronentransport-Schema zeigt die Abbildung 1 (nach Hildebrandt und Estabrook, 1971).

Die Vorstellung eines solchen Elektronentransport-Schemas wurde vornehmlich durch spektrale Veränderungen des

Abbildung 1: Elektronentransportschema der mikrosomalen mischfunktionellen Oxydation (nach Hildebrandt und Estabrook, 1971).



Fp₁: NADPH-Cytochrom c-Reduktase

Fp₂: NADH-Cytochrom b₅-Reduktase

Cytochrom P-450 ermöglicht. Der Darstellung des Absolutspektrums des Cytochrom P-450 stellen sich besonders zwei Schwierigkeiten entgegen: die unter dem Einfluß der Isolierungsprozedur entstehende inaktive Form mit "normalem" Hämoproteinspektrum eines b-Typs und einem Absorptionsmaximum bei 420 nm ("Cytochrom P-420") und zum anderen der interferierende Einfluß des Cytochrom b₅. Diesen beiden Schwierigkeiten läßt sich entgehen, indem entweder der optisch wirksame Cytochrom b₅-Anteil ausgeglichen wird oder das Cytochrom P-450 selbst isoliert wird. Die erste Methode (Kinoshita und Horie, 1967) beruht auf einer ungleich starken Induzierungsmöglichkeit der beiden Pigmente P-450 und Cytochrom b₅. Dieses wird durch Vorbehandlung mit einer Reihe von Fremdstoffen erreicht, die zu einer starken Zunahme des Cytochrom P-450-Gehaltes führt. So kann nach Ausgleich der Cytochrom b₅-Anteile in Vergleichs- und Probeküvette der stärker induzierte P-450-Gehalt als scheinbares Absolutspektrum in Erscheinung treten. Die Erfassung des echten Absolutspektrums bleibt der Methode der Isolierung vorbehalten.

rung vorbehalten, die auch frei von anderen Einflüssen ist, wie beispielsweise der größerer NADPH- und NADH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität.

Gleich welcher Behandlung unterzogen, zeigten alle Anordnungen ein dreigipfliges Absolutspektrum im oxydierten Zustand der Endoxydase (siehe Tab. I). Die Absorptionsmaxima liegen im Soret-Bereich bei 415-418 nm; die Gipfel im sichtbaren Bereich bei 532-537 nm und bei 565-570 nm. Die spektralen Veränderungen nach Reduktion haben zu Vermutungen Anlaß gegeben, daß sich auch der Spin-Status der Elektronen von einer low spin-Form im oxydierten Zustand (Hashimoto et al., 1962; Mason et al., 1965; Ichikawa und Yamano, 1967, a) zu einer high spin-Form als reduziertes Cytochrom gewandelt hat (Miyake et al., 1968).

Während die Entstehung des Absorptionsmaximums bei 450 nm nach Kohlenmonoxid-Begasung die Eigenart des Cytochrom P-450 beschreibt, ist die Ursache des verschiedentlich (Tab. I) aufgetretenen Absorptionszuwachses um 420 nm umstritten (Mitani et al., 1971). Neben der Verunreinigung durch Hämoglobin ist an die Entstehung des enzymatisch inaktiven "Cytochrom P-420" zu denken, das im Gegensatz zum P-450 löslich ist und unter Einwirkung von organischen Lösungsvermittlern, metallbindenden Substanzen oder bestimmten Enzymen wie Phospholipase und Trypsin gebildet wird (Omura und Sato, 1964, b; Imai und Sato, 1967, a). Eine eingehende Untersuchung von Ichikawa und Yamano (1967, b) zeigte, daß die Fähigkeit der Substanzen zur Bildung der inaktiven Form des Cytochrom P-450 einhergeht mit deren Grad an lipophilem Bindungsvermögen. Durch bestimmte Verfahren wie Dialyse oder Waschen war eine Rückkehr in die aktive Form möglich.

Zugabe von oxydierbaren Substanzen in die Probeküvette verändert die spektralen Eigenschaften des im oxydierten Zustand erfaßten Differenzspektrums der mikrosomalen Fraktion in charakteristischer Weise. Dabei lassen sich zwei spektrale Typen unterscheiden (Schenkman et al., 1967, a; Remmer et al., 1966; Imai und Sato, 1966, a). Als Hauptvertreter der Substrate, die das Typ I-Spektrum hervorrufen,

Tabelle I.: Absolutspektren des Cytochrom P-450 in oxydiertem und reduziertem Zustand und nach Begasung mit Kohlenmonoxid.

Zustand	Soret	beta	alpha	Spezies	Behandlung	Autor
oxydiert	418	537	568	Ratten	PB, triton-gelöst	1.
	415	535	565	Kaninchen	PB, Lubrol, "subparticles"	2.
	418	534	568	Kaninchen	PB, optischer Ausgleich	3.
	281	418	535	570	Pseudomonas putida gereinigt	4.
	418	535	570	Kaninchen	PB, "P-450-subparticles"	5.
	416	532	570	Küken-Embryo	protease-gelöst	6.
	360	415-418	532	567	Kaninchen PB, "sub-microsomal particles"	7.
reduziert	418	545				1.
	415	545				2.
	423	553				3.
	408	540				4.
	414	550				5.
	415	530				6.
	414	543				7.
reduziert und CO-begast	423	450	548			1.
	425	450	555			2.
	---	450	---			3.
	---	447	550			4.
	---	450	560			5.
	420	450	550			6.
	---	450	552			7.

1. Fujita und Mannering, 1971

2. Jefcoate und Gaylor, 1969

3. Hildebrandt et al., 1968

4. Peterson, 1971

5. Yong et al., 1970

6. Mitani et al., 1971

7. Miyake et al., 1968

gilt Hexobarbital, welches bei 388 nm ein Absorptionsmaximum und bei 420-422 nm ein Absorptionsminimum zeigt. Prototyp der Typ II-Substrate ist das Anilin. Typ II-Verbindungen zeigen mit dem Cytochrom P-450 ein dem Typ I-Spektrum spiegelbildliches Verhalten mit Absorptionsspitzen um 425-430 nm und Minima um 390-405 nm. Nach Untersuchung einer Vielzahl von Substanzen auf ihre Typenzugehörigkeit bleibt als gemeinsame Eigenschaft der Typ II-Substrate ihr Stickstoffgehalt. Verbindendes Kennzeichen aller Typ I-Substrate scheint deren vergleichsweise höhere Lipophilie zu sein (Schenkman et al., 1967, a; Ullrich, 1969).

Diese charakteristischen Merkmale führten zu einer weiterleitenden Unterscheidung im Hinblick auf die Bindungsart der spektral differenzierbaren Verbindungen. So hat das Unvermögen der durch Isooktan extrahierten Mikrosomen zur Bildung von Typ I-Spektren, ohne die spektralen Veränderungen im Sinne des Typ II-Spektrums qualitativ zu beeinflussen, an eine Abhängigkeit der Typ I-Bindung vom Phospholipidgehalt des Cytochrom P-450 denken lassen (Leibman und Estabrook, 1971). Eine Herabsetzung der Typ I-Bindungsfähigkeit erfolgte auch nach Steapsinbehandlung oder längerer Lagerung im Kühlraum (Shoeman et al., 1969). Während das Typ I-Spektrum vermutlich eher eine Charakteristik des Lipoproteinanteils des Cytochroms ist (Schenkman und Sato, 1968), scheinen Typ II-Verbindungen unmittelbar mit dem Eisen - möglicherweise auf der CO-Bindungsseite des Hämoleküls - zu reagieren und spektrale Wirksamkeit im Sinne eines Hämochromogens zu entfalten (Schenkman et al., 1967, a).

Eine direkte Interaktion mit der CO- und damit auch der O₂-Bindungsseite des Cytochrom P-450 - denn CO und O₂ wirken kompetitiv (Omura et al., 1965; Cooper et al., 1965) - erklärte auch den Einfluß der Typ II-Substrate auf die Reduktionsgeschwindigkeit des Cytochrom P-450 als einer Verlangsamung. Typ I-Substrate dagegen erhöhen die Reduktionsgeschwindigkeit (Gigon et al., 1969). Messungen des "steady state"-Spiegels von dem Komplex des

reduzierten Cytochrom P-450 mit CO zeigten regelmäßig eine Erhöhung unter Typ I-Substraten, eine Senkung aber unter Verbindungen, die das Typ II-Spektrum hervorrufen. Die Aktivität der NADPH-Cytochrom c-Reduktase war unter beiden Substrattypen unverändert (Sasame und Gillette, 1969). Die NADPH-Oxydation wird durch Typ I-Substrate gesteigert, durch Typ II-Substrate aber kaum verändert oder gehemmt (Gillette, 1969; Gigon et al., 1969). Durch Kohlenmonoxid wird die NADPH-Oxydation um 30-50% gehemmt (Gillette, 1966).

Zahlreich sind auch die Interaktionsmöglichkeiten der Substrate untereinander. Während die Bindung der Typ I-Substrate durch Typ II-Substrate kompetitiv gehemmt wird (Leibman et al., 1969) und der Metabolismus der Typ I-Substrate durch Typ II-Substrate negativ beeinflußt wird (Sasame und Gillette, 1970), erhöhen die Typ I-Substrate das Typ II-Bindungsvermögen. Substrate des gleichen Typs hemmen sich dagegen unkompetitiv, wenn sie dem zweiten Typ angehören - uneinheitlich dagegen bei Typ I-Substraten (Leibman et al., 1969). Es ist in diesem Zusammenhang an zwei interkonvertible Formen des Cytochroms gedacht worden, von denen die eine (EX), primär an Membranteile oder endogene Produkte gekoppelt, mit beispielsweise Hexobarbital (Typ I) eine Bindung eingeht (EI) und spektral als Typ I imponiert. In dieser Bindung ist durch Anilin (Typ II) eine Umwandlung in eine spektral als Typ II in Erscheinung tretende Form (EII) möglich, was die Zunahme des Typ II-Spektrums durch Typ I-Substrate verständlich machte. Die andere Form (E) existiert frei und bildet unmittelbar die für das Typ II-Spektrum verantwortliche Verbindung mit Typ II-Substraten (EII) (Leibman und Estabrook, 1971). Untersuchungen von Schenkman (1970) vermuten auf Grund des "asymmetrischen" Tales im Typ II-Spektrum ein kombiniertes Typ I- und Typ II-Spektrum, so daß im vorhergehenden Schema an die Möglichkeit der Bindung von Typ II-Substraten an die membrangebundene EX-Form zu denken ist.

Weiteren Aufschluß über die Unterschiedlichkeit der beiden

Bindungsarten verschafft die selektive Erhöhung einer Bindungsart durch Vorbehandlung der Tiere mit Substanzen, die für ihre induktive Wirkung auf den Arzneimittelstoffwechsel bekannt sind. Schon 1954 beobachteten Brown et al. den stimulierenden Effekt von Fremdstoffen auf die Enzymaktivitäten. Den Nachweis vermehrter Enzym-Proteinsynthese durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe lieferten Conney et al. (1956; 1957). Auch Phenobarbital erwies sich als wirkungsvoller Induktor der Arzneimittelhydroxylasen (Remmer, 1959). Remmer und Merker (1963) legten diesen Befunden eine Proliferation des endoplasmatischen Retikulums zu Grunde, die von Fouts und Rogers (1965) vornehmlich in den "smooth"-Anteilen spezifiziert wurde. Das chemische Korrelat dieser Veränderungen ist eine Zunahme des Gehaltes an Protein, RNA, Phospholipiden und Cholesterin im rauen und "smooth I"-Anteil der Mikrosomen (Glaumann, 1970).

Inzwischen sind mehr als 200 Pharmaka, Insektizide, Karzinogene und andere Chemikalien bekannt, welche die arzneimittelabbauende Enzymaktivität in den Lebermikrosomen zu stimulieren vermögen (Conney, 1967). Letztlich sind es zwei Typen von induzierenden Substanzen, deren Hauptvertreter Phenobarbital (PB) und 3-Methylcholanthren (3-MC) sind. Während PB eine breite Skala verschiedenartiger Reaktionen beeinflusst (Oxydation, Reduktion, Glukuronidierung, Hydrolyse), stimulieren die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe eine begrenzte Gruppe von Reaktionen (siehe Tab. II). Um den Ursachen dieser stimulierenden Einflüsse nachzugehen, wurde nach Parametern gefahndet, die in einer gewissen Korrelation zum Stimulierungseffekt standen. Dabei zeigte sich eine auffällige Steigerung des Cytochrom P-450-Gehaltes sowohl nach PB- als auch nach 3-MC-Vorbehandlung (Remmer, 1969; Kamin et al., 1965). Um den Befund einer vermehrten Syntheseleistung sicherzustellen und die Möglichkeit eines verminderten Enzymabbaues oder anderer mittelbarer Einflüsse auszuschließen - beispielsweise eine Veränderung der Membraneigenschaften -, wurden Versuche durchgeführt, bei denen simultan Hemmstoffe der Eiweiß-

Tabelle II.:Einfluß der Vorbehandlung mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen (3-Methylcholanthren oder 3,4-Benzpyren) und Phenobarbital auf verschiedene Abbauege von Arzneimitteln (nach Conney, 1967, mit folgenden Ergänzungen: 1. Netter, 1966; 2. Sladek und Mannering, 1969, a; 3. Gigon und Bickel, 1971; 4. Sladek und Mannering, 1966, b; 5. Lu et al., 1971; 6. Alvares et al., 1967; 7. Uehleke und Hellmer, 1971).

		polyzyklische Kohlenwasser- stoffe	Phenobarbital
Aliphatische Hydroxylierung	Hexobarbital	-	+
	Pentobarbital	-	+
O-Desalkylierung	Monomethyl-p-Nitranilin		+ 1.
	3-MNAB	+	+ 2.; 3.
	Äthylmorphin	-	+ 2.; 3.; 4.
	Aminopyrin	-	+
	Meperidin	-	+
	N-Methylbarbital	-	+
	Benzphetamin	(+)	+ 5.
Sulfoxydation	Chlorpromazin	-	+
Aromatische Hydroxylierung	3,4-Benzpyren	+	(+) 5.; 6.
	Azetanilid	+	
	Zoxazolamin	+	+
N-Hydroxylierung	N-Äthylanilin	+	
	4-Chloranilin		+ 7.
	Anilin	+	
	2-Acetylamino-fluoren	+	
O-Desalkylierung	Acetophenetidin	+	+
	p-Nitroanisol	+	+
	N-Monomethyl-p-Nitranilin		-

synthese und induzierende Substanzen appliziert wurden. Nach Gaben von Äthionin (Conney et al., 1956; Alvares et al., 1967), Puromycin (Conney und Gilman, 1963; Gelboin und Blackburn, 1964; Orrenius et al., 1965) und Aktinomycin D (Gelboin und Blackburn, 1964; Conney und Gilman, 1963) war der Induktionseffekt von PB und 3-MC blockiert. Auch der beschleunigte Einbau markierten Leucins in mikrosomales Eiweiß deutet auf eine vermehrte Synthese hin (Shuster und Jick, 1966). Versuche mit ^{14}C -markiertem Häm zeigten, daß eine Zunahme der Hämsynthese mit der Vermehrung des P-450-Gehaltes nach PB-Induktion einhergeht (Greim et al., 1970). Dafür spricht auch, daß Aminotriazol (3-Amino-1,2,4-triazol), ein Hemmstoff der δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase und damit des zweiten Schrittes der Hämbiosynthese, den Zuwachs an Cytochrom P-450 aufhob. Keinen Einfluß hatte dieser selektiv häm-wirksame Hemmstoff auf die Zunahme des Flavoproteins NADPH-Cytochrom c-Reduktase (Baron und Tephly, 1969), die ebenfalls nach PB- oder 3-MC-Stimulierung zu verzeichnen ist (Kamin et al., 1965; Orrenius und Ernster, 1964; Ernster und Orrenius, 1965; Jick und Shuster, 1966). Der Gehalt an Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase war nach Induktion kaum verändert oder nur geringgradig angestiegen (Ernster und Orrenius, 1965; Kamin und Masters, 1968).

Die induzierende Wirkung von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen und PB führt nicht zu einer erhöhten Affinität des Enzyms für das Substrat. Trotz des Anstiegs der maximalen Geschwindigkeit für die N-Demethylierung, Sulfoxydation und weitere oxydative Abbauewege fanden Rubin et al. (1964) keine Änderung der Michaeliskonstanten. Die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes blieb auch bei Versuchen über den induktiven Effekt von PB und 3,4-Benzpyren auf die O-Demethylierung von p-Nitroanisol unverändert (Netter und Seidel, 1964). Dagegen liegt der höheren arzneimittel-oxydierenden Aktivität des männlichen gegenüber dem weiblichen Geschlecht tatsächlich eine höhere Affinität beim männlichen Tier zu Grunde (Schenkman et al., 1967, b).

Unterschiede der beiden Induktortypen zeigten sich in der quantitativen Zunahme des P-450-Gehaltes, die nach drei Tagen PB-Behandlung den Faktor 6 erreichte - nach Benzpyren im gleichen Zeitraum nur 2,5. Dies kommt der zweifachen Zunahme nach 48-stündigem Fasten der Tiere nahe (Remmer, 1969). Abweichend ist weiterhin das Verhalten nach Abbrechen der Stimulierung. Während die N-Demethylierungsaktivität von 3-MMAB und der P-450-Gehalt nach PB-Induktion innerhalb von 5 Tagen auf den alten Wert zurückging (Orrenius, 1965; Remmer und Merker, 1965), blieb die erhöhte Abbauwirksamkeit nach 3-MC über längere Zeit erhalten. Als Ursache dieser prolongierten Wirkung ist an eine vermehrte Ablagerung der lipophilen Kohlenwasserstoffe in den Fett-Depots des Organismus oder aber einen verlangsamten Rückgang der gesteigerten Hämproteinbildung gedacht worden (Sladek und Mannering, 1969).

Ein prompter Anstieg in der Synthesegeschwindigkeit der NADPH-Cytochrom c-Reduktase erfolgt bereits nach einer einzigen Dosis PB. Diese Zunahme wird erst bei wiederholter Dosierung von einem mäßigen Anstieg im Cytochrom b_5 -Gehalt begleitet. Nach Absetzen der PB-Behandlung erfolgt eine rasch fortschreitende Verminderung des NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Gehaltes, hervorgerufen durch eine erhöhte Abbau-geschwindigkeit des Flavoproteins (Kuriyama et al., 1969).

Der spezifisch mikrosomalen Wirkungstendenz des PB entspricht ein 20-40%iger Anstieg des mikrosomalen Eiweißes, berechnet auf g Lebergewicht (Remmer und Merker, 1963). 3-MC scheint eher die Synthese des Gesamt-Leberproteins zu steigern (Arcos et al., 1961; Conney, 1967). Ein interessanter Vergleich zu dieser generellen Stimulierung der Proteinsynthese unter 3-MC ist die erhöhte Wirksamkeit des Leberchromatins als RNS-Schablone unter 3-MC-Behandlung (Bresnick und Mossé, 1969; Madix und Bresnick, 1967). Auf zwei verschiedene Wirkmechanismen deutet auch der Umstand hin, daß sich durch kombinierte Gabe von 3,4-Benzpyren und PB ein potenziertter Induktionseffekt erreichen läßt, wie er sich auch bei Dosissteigerung jeder einzelnen Substanz

nicht einstellt (Gillette, 1963, a; Sladek und Mannering, 1969). Unterschiedlich ist auch das Verhalten des durch Induktion gesteigerten Stoffwechsels unter Hemmstoffen. So benötigen 3-MC-vorbehandelte Tiere 10 mal mehr SKF 525 A zur Halbhemmung der N-Demethylierung von 3-MMAB als PB-stimulierte oder unbehandelte Tiere (Mannering, 1971, a).

Auf Grund von Untersuchungen der EPR-Spektren erfolgte die Zuordnung der PB-stimulierten Lebermikrosomen in deren Hämoprotein-Charakteristik zur low spin-Form; das Resonanzspektrum nach 3-MC-Stimulierung zeigte eine high spin-Form (Hildebrandt et al., 1968; Peisach und Blumberg, 1970). Diese Unterschiede waren jenen vergleichbar, die Cammer et al. (1966) für Veränderungen beobachteten, die nach der Bindung von Anilin (Typ II) und Hexobarbital (Typ I) auftraten. Übereinstimmend fanden Hildebrandt et al. (1968) und Jefcoate et al. (1969) ein unterschiedliches Bindungsvermögen von Anilin bzw. von primären Aminen an das mikrosomale Cytochrom PB-vorbehandelter bzw. 3-MC-vorbehandelter Tiere. So führte die Zugabe von Anilin zur 3-MC-induzierten Form zu einem Spektrum, das dem des PB-induzierten Cytochrom P-450 glich, und umgekehrt: die Zugabe von Hexobarbital zur PB-induzierten Form erbrachte die Ausbildung des für 3-MC-induziertes Cytochrom P-450 typischen Spektrums.

Die Erfassung des Differenzspektrums reduzierter Mikrosomen nach CO-Begasung einer Küvette zeigt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums bei 450 nm um einige Nanometer zu. Erzwungenen Bereich, wenn die Mikrosomensuspension von einem 3-MC-stimulierten Tier stammte (Sladek und Mannering, 1966, a; Hildebrandt et al., 1968; Alvares et al., 1968; Gnosspeilius et al., 1969/70). Dieses Cytochrom "P₁-450" (Sladek und Mannering, 1966, a) wurde nach 16 Stunden (Gnosspeilius et al., 1969/70) bzw. nach ein bis zwei Tagen (Shoeman et al., 1969) nach der 3-MC-Stimulierung nachweisbar, was der gegenüber der PB-Induktion verspätet einsetzenden Zunahme der Stoffwechselaktivität gut vergleichbar ist. Die Verschiebung des Absorptionssgipfels auf die

Wellenlänge 446 nm (Hildebrandt et al., 1968) bzw. 448 nm (Alvares et al., 1967; Fujita und Mannering, 1971; Greene et al., 1971) nach CO-Begasung des dithionitreduzierten Ansatzes ist nicht durch Bindung des verbliebenen Kohlenwasserstoffes an das Cytochrom bedingt, wie durch in vitro-Versuche ausgeschlossen werden konnte (Jefcoate und Gaylor, 1969).

Das Postulat zweier Cytochromformen, welche unabhängig voneinander bei simultaner PB- und 3-MC-Verabfolgung gebildet werden (Bidleman und Mannering, 1970), wurde gestützt durch ein unterschiedliches Substratbindungsverhalten. Während beide Induktortypen positiv auf das Typ II-Spektrum wirken, ist das Typ I-Spektrum nach 3-MC-Induktion vermindert (Shoeman et al., 1969; Schenkman et al., 1969; Renner et al., 1969). Mannering (1971, a) wies nach, daß "P₁-450" nur noch in der Lage ist, Typ II-Spektren zu zeigen, während die Typ I-Bildungsfähigkeit gänzlich erloschen ist.

Zu der Vorstellung zweier Cytochromformen, die sich in einem pH-abhängigen Gleichgewicht befinden (Imai und Sato, 1966, b), führten Versuche über das Bindungsspektrum von Äthylisocyanid (EtNC), einem Typ II-Substrat (Kröber et al., 1970), an das reduzierte Cytochrom P-450 (Omura und Sato, 1964, a). Dieses Bindungsspektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 430 nm und 455 nm. Zweigipflige Soret-Banden mit dem reduzierten Cytochrom treten auch mit Pyridin und mit Anilin auf. Das Verhältnis beider Gipfel zueinander ist dabei ebenfalls pH-abhängig; die Substanzen zeigen kompetitive Eigenschaften gegenüber CO (Imai und Sato, 1967, b). Während das Verhältnis der Gipfel durch Induktion mit PB nicht verändert wird (Lange, 1968), begünstigt 3-MC-Behandlung die Bildung des 455 nm-Gipfels unter EtNC (Alvares et al., 1967). Sladek und Mannering (1966, a) fanden als pH-Wert, bei dem die EtNC-bedingten Absorptionsmaxima in der Soret-Region gleich groß sind, einen höheren Wert bei PB-behandelten und Kontrolltieren (pH 7,4) als bei 3-MC-induzierten Tieren (pH 6,9). Nach Reduktion der Mikrosomen mit NADPH zeigt auch Piperonyl-Butoxid (Typ I)

eine zweigipflige Soret-Bande (Philpot und Hodgson, 1971).

EtNC hat zusätzliche Bedeutung erlangt, da es neben einer Hemmwirkung auf den Arzneimittelstoffwechsel einen Typ der Stoffwechselbeschleunigung erzeugt, der von der Induktion zu unterscheiden ist. Diese Substanz - und weiterhin auch Aceton und Metyrapon (MP) - beschleunigt das Stoffwechselgeschehen in vitro, so daß eine unmittelbare Wechselwirkung gefordert werden muß, die keine Syntheseleistung des Fremdstoffe abbauenden Enzymsystems benötigt. So besitzt EtNC sowohl eine steigernde als auch eine hemmende Wirkung auf die Anilinhydroxylierung (Imai und Sato, 1966, c; 1968, b). Der hemmende Effekt stellt sich erst mit zunehmender Konzentration von EtNC ein. Für diesen Hemmeffekt wurde eine kompetitive Behinderung des Sauerstoffes an der Endoxydase verantwortlich gemacht. Im Gegensatz zu der Wirkung anderer Typ II-Substrate ist die Cytochrom P-450-Reduktion unter EtNC erhöht (Imai und Sato, 1968, a). Auch Aceton bewirkt eine Zunahme der Anilinhydroxylierung, die bei Konzentrationen von 0,45 - 0,9 M maximal ist (Anders, 1968).

Metyrapon (2-Methyl-1,2-bis-(3-pyridyl)-1-propanon) wurde zunächst als Hemmstoff der 11- β -Hydroxylase bei Steroiden bekannt (Liddle et al., 1958; Chart und Sheppard, 1959). Es diente deshalb im "Metopirontest" zur Erfassung der Rückkopplung zwischen Nebennierenrinde und Hypophysenvorderlappen, welcher beim Gesunden vermehrt ACTH ausschüttet, wenn sich unter MP die unwirksamen 11-Desoxy-Vorstufen der Steroide bilden (Blunck und Bierich, 1968; Dexter et al., 1967; Eckler et al., 1962; Gaunt et al., 1965; Liddle et al., 1962). Weiterhin hemmt MP auch die C₁₈-Steroidhydroxylierung (Kraulis und Birmingham, 1963; Erickson et al., 1966) und die C₁₉-Steroidhydroxylierung (Sanzari und Péron, 1966).

Einen hemmenden Einfluß übt MP auch auf den oxydativen Arzneimittelstoffwechsel zum Beispiel von Hexobarbital und Amidopyrin aus (Leibman, 1969). Die N-Hydroxylierung von 4-Chloranilin und 2-Naphthylamin wird in kompetitiver Weise gehemmt; die Geschwindigkeit der N-Demethylierung von N-Methylanilin und von Perazin sinkt unter MP (Uehleke et

al., 1971). Ebenfalls hemmend ist der Einfluß von MP auf die O-Demethylierung von p-Nitroanisol (Netter et al., 1969). Die Wirkung auf die Hydroxylierung von Acetanilid ist konzentrationsabhängig unterschiedlich; der stimulierende Einfluß in kleinen Konzentrationen (Leibman, 1969) verkehrt sich bei höheren Konzentrationen (10^{-2} M) in einen Hemmeffekt (Leibman, 1969; Netter et al., 1967). In dieser Eigenschaft der konzentrationsabhängigen Wirkung mit EtNC vergleichbar, besitzt MP wie EtNC auch die Fähigkeit, mit dem reduzierten Cytochrom P-450 eine Bindung einzugehen, die spektral mit einem Absorptionsmaximum bei 446 nm in Erscheinung tritt (Hildebrandt et al., 1969). Aus einem weiteren Absorptionsmaximum bei 454 nm nach Gabe von MP in beide Küvetten und CO-Begasung der Probeküvette schlossen Hildebrandt et al. (1969) auf zwei Cytochromformen, P-446 und P-454. Nach diesen Autoren ist P-446 in den Stoffwechsel der Typ I-Substrate einbezogen, während P-454 an der Hydroxylierung der Typ II-Verbindungen beteiligt ist. MP wirkt danach entweder durch Bildung eines inaktiven MP-P-446-Komplexes - was die Hemmung der Typ I-Substrate erklärte - und Weiterleitung der Elektronen auf das Cytochrom P-454 oder durch eine Verschiebung im Gleichgewicht der beiden Cytochromformen zugunsten der P-454-Form. Hieraus wäre leicht eine Begründung der stimulierenden Wirkung auf die Acetanilidhydroxylierung abzuleiten.

In der mitochondrialen Atmungskette bewirkt MP einen Block auf der Ebene der Flavoproteine, wie Kahl und Simon (1971) mit isolierten Rattenlebermitochondrien nachweisen konnten. Ein verminderter Sauerstoffverbrauch von Mikrosomen konnte nur bei Anwesenheit eines exogenen hydroxylierbaren Substrates aufgezeigt werden (Kahl und Netter, 1970). Auf eine direkte Hemmung der mischfunktionellen Oxydation läßt die verminderte Oxydation des reduzierten Cytochrom P-450 unter MP schließen (Hildebrandt et al., 1969).

Der Hauptmetabolit des MP ist das an der aliphatischen Keto-Gruppe reduzierte MP (Sprunt et al., 1967; Kraulis et

al.,1968).Seine Entstehung konnte durch in vitro-Versuche auf eine mikrosomale NADPH-abhängige Reduktase zurückgeführt werden (Kahl,1970,a).Dieser reduzierte Metabolit weist ebenfalls inhibitorische Eigenschaften auf.Die 11- β -Hydroxylierung der Steroide wird in gleichem Ausmaß wie durch MP selbst gehemmt (Colby und Brownie,1970),während die Wirkungen des Metaboliten auf den Fremdstoffwechsel hinter denen des oxydierten Ausgangsstoffes zurückbleiben (Netter et al.,1969).Auch die Ausbildung der spektralen Veränderungen durch das reduzierte MP erfolgt mit einer höheren spektralen Dissoziationskonstante (Kahl,1970,b).

ZIEL DER ARBEIT

1. Die Untersuchungen gehen von der Bindungscharakteristik aus, die für Metyrapon innerhalb reduziert gehaltener Mikrosomen als sogenanntes P-446 beschrieben ist. Es soll geklärt werden, ob diese spektralen Veränderungen für Metyrapon spezifisch sind oder ob sie sich auch durch strukturverwandte Verbindungen hervorrufen lassen. Die Versuche werden mit phenobarbitalstimulierten Rattenlebermikrosomen durchgeführt. Als Vergleichssubstanzen werden reduziertes Metyrapon, 1-(2-Pyridyl)-2-(4-Pyridyl)-Äthylen, 1-(2-Pyridyl)-2-(3-Pyridyl)-Äthylen, 3-(3-Pyridyl)-Propanol und Pyridin ausgewählt.
An einem Hämolekül, dem Chlorhäm, als Modell für eine an dem Entstehen der Bindungscharakteristik im Cytochrom P-450 möglicherweise beteiligte Komponente wird der Vergleich der Substanzen ebenfalls durchgeführt.
2. Die mögliche Verwandtschaft des metyraponbedingten Absorptionsmaximums bei 446 nm mit dem sogenannten P-448 als der spektralen Charakteristik des Komplexes des reduzierten Cytochrom P-450 mit Kohlenmonoxid nach Vorbehandlung mit 3-Methylcholanthren verfolgen die weiteren Versuche. Es werden Experimente mit 3-Methylcholanthren und Phenobarbital als Induktoren durchgeführt. Durch spektralanalytische Untersuchungen wird die Affinität von Metyrapon zu dem nach unterschiedlicher Vorbehandlung vorliegenden Cytochrom in Form von K_S -Werten bestimmt.
3. Es schließen sich Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung von Metyrapon und den genannten Vergleichssubstanzen auf die oxydative Demethylierung von p-Nitroanisol an. Dabei soll geprüft werden, inwieweit die spektralen Veränderungen dieser Substanzen innerhalb reduzierter Mikrosomen der inhibitorischen Wirkung entsprechen.
4. Nachdem spektrale Veränderungen und inhibitorische Wirkungen für die Substanzen aufgefunden sind, soll sich eine nähere Analyse der mit Pyridinderivaten hervorrufbaren spektralen Veränderungen anschließen. Hierbei wird die Abhängigkeit der bei 425 und 446 nm vorliegenden Absorption vom pH des Inkubationsmediums geprüft.

Die enge spektrale Nachbarschaft der Bindungscharakteristiken des reduzierten Cytochrom P-450 mit Metyrapon (446 nm) und Kohlenmonoxid (450 nm) führte zu Versuchen, in denen die Verdrängbarkeit von Metyrapon von seinem Bindungsort am Cytochrom P-450 durch Kohlenmonoxid dargestellt wird.

METHODEN

1. Herstellung der Mikrosomenfraktion

a) Vorbehandlung

Vier Arten der Vorbehandlung von männlichen Sprague-Dawley-Ratten (150-170 g) wurden angewandt: eine Gruppe erhielt an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine intra-peritoneale Injektion von 0,5 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung, in welcher bei der zweiten Gruppe Natrium-Phenobarbital in einer Konzentration gelöst war, die auf 80 mg pro kg Körpergewicht berechnet war. Eine dritte Gruppe von Tieren erhielt eine Dosis von 20 mg pro kg Körpergewicht 3-Methylcholanthren, suspendiert in Sonnenblumenöl; die vierte Gruppe erhielt zur Kontrolle allein die Menge von 3 mal 0,5 ml Öl an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Den Ratten stand Wasser ad libitum zur Verfügung. Altromin^R-Trockenfutter (Fa. Altromin Lage/Lippe) wurde etwa 8 Stunden vor der Tötung entzogen.

b) Aufbereitung

Nach Dekapitation wurden die Ratten gut ausgeblutet und die Lebern in situ mit kalter 0,9 %iger NaCl-Lösung durch die Pfortader gespült, um die Erythrozyten herauszuwaschen, bis die Leber bei zusätzlicher Massage blaß erschien (2-3 Min.). Anschließend wurden die Lebern gewogen und bis zum dreifachen Gewicht mit Saccharose-Versen-Tris (SVT)-Lösung versetzt (Saccharose 0,25 M; Versen bzw. Titriplex III bzw. EDTA 0,005 M; Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 0,02 M; mittels 1 N HCl auf pH 7,4) (Leybold und Staudinger, 1959). Im Kühlraum bei maximal 4° C wurden die Lebern homogenisiert und anschließend 15 Min. lang bei 1600 x g und weitere 30 Min. bei 9000 x g in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert, um Kerntrümmer und Mitochondrien zu entfernen. Der 9000 x g-Überstand wurde hierauf in einer MSE-65-Ultrazentrifuge 60 Min. lang bei 105000 x g zentrifugiert. Das dabei entstandene Sediment wurde in SVT-Lösung resuspendiert und einer erneuten Zentrifugation (60 Min., 105000 x g) unterworfen. Dieser Waschvorgang wurde

wiederholt und das Resediment nunmehr erneut in SVT-Lösung suspendiert und bei -20°C eingefroren.

c) Eiweißbestimmung

Die Eiweißbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951). Als Standard diente Lab-Trol^R (Dade Reagents Inc., USA). Nach Kenntnis des Eiweißgehaltes wurden Proben mit 5 mg Proteingehalt einzeln abgefüllt und erneut bei -20°C eingefroren, um eine möglichst standardisierte Alterung der für einen Ansatz erforderlichen Eiweißmenge nach dem Auftauen zu gewährleisten.

2. Spektralanalytische Untersuchungen

a) Technische Verfahrensweisen

Sämtliche spektralanalytischen Untersuchungen wurden am Doppelwellenlängen-Spektralphotometer Aminco-Chance durchgeführt. Alle Messungen erfolgten bei einer Temperatur von $+30^{\circ}\text{C}$. Es wurden Küvetten von 1 cm Lichtweg verwendet. Zwei grundsätzlich verschiedene Verfahrensweisen sind zu unterscheiden:

I. Das "Spalt-Strahl"-Verfahren zur Erfassung von Differenzspektren (Split-beam-mode). Hierbei treffen zwei Lichtstrahlen gleicher Wellenlänge jeweils Probe- und Vergleichsküvette, die den geteilten Doppelansatz eines bislang identisch behandelten Ansatzes enthalten. In einem zuvor bestimmten Wellenlängenbereich wird eine Grundlinie gleicher Lichtabsorption errichtet. Nach Einbringen der die Absorption verändernden Substanz in die Probeküvette und Zusatz eines gleichen Volumens des verwendeten Lösungsmittels zur Vergleichsküvette wird die Extinktionsdifferenz zwischen beiden Küvetten in Abhängigkeit von der Wellenlänge registriert.

II. Das Doppel-Wellenlängen-Verfahren zur Erfassung von Absorptionsveränderungen als Funktion der Zeit (Dual-wavelength-mode). Bei dieser Methode fallen zwei Lichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge abwechselnd in rascher Folge durch eine Küvette. Die erhaltene Extinktionsdifferenz stellt die unterschiedliche Absorption als Funktion der Zeit dar. Dieses Verfahren

dient zur Ermittlung von Umsatzgeschwindigkeiten. Als Wellenlängenpaar wird die Kombination eines Absorptionsmaximums mit einer Wellenlänge mit möglichst geringer Absorptionsveränderung (isosbestischer Punkt) angestrebt.

b) Durchführung

Der Ansatz enthielt in der Regel 0,067 M Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,4) und die Mikrosomensuspension, deren Menge auf die Endkonzentration von 1 mg Eiweiß pro ml Ansatz berechnet war.

Die Ermittlung der pH-Abhängigkeit des metyraponbedingten Absorptionsmaximums bei 446 nm erfolgte in Sörensen-Phosphat-Puffer und Glycin-Puffer (beide 0,1 M). Die durch Zugabe von Natriumdithionit (1mg pro ml Ansatz) hervorgerufene pH-Senkung um etwa 0,2 - 0,3 pH-Einheiten wurde berücksichtigt.

Zur Erfassung der spektralen Dissoziationskonstanten und der Hemmbarkeit der p-Nitroanisol-Demethylierung wurden alle untersuchten Substanzen in aqua bidest. gelöst bzw. verdünnt und zwei Minuten nach Eingabe in der Probeküvette inkubiert. Der Berechnung der Bindungskonstanten der untersuchten Substanzen an das reduzierte Cytochrom P-450 liegen Extinktionsdifferenzen zwischen 446 und 490 nm zu Grunde. Sie wurden aus dem wiederholt registrierten Differenzspektrum des dithionitreduzierten Ansatzes abgeleitet, dem die getestete Substanz in steigender Konzentration kumulativ zugesetzt worden war.

Die p-Nitroanisol-Demethylierung dient als Modellreaktion zur Messung der O-Demethylierung. Sie wurde im Doppel-Wellenlängenverfahren bei dem Wellenlängenpaar 405 und 485 nm gemessen (Methode nach Netter, 1960; verändert nach Lier, 1972). Der Ansatz enthielt 0,067 M Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,85), ein NADPH-regenerierendes System, bestehend aus 11,5 μ Mol Glucose-6-Phosphat, zwei Einheiten Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 1 μ Mol NADP sowie 5 μ Mol Nicotin-säure-amid pro Ansatz.

Der nicht reduzierte Ansatz verblieb 5 Minuten lang zur

Äquilibrierung bei 30° C im Küvettenständer des Photometers. Nach Start mit NADP wurde die Bildung des p-Nitrophenol 90 Sekunden lang registriert, bis die Zugabe des Inhibitors erfolgte. Es wurden mindestens zwei verschiedene Mikrosomenfraktionen für eine Versuchsanordnung verwendet.

Die Bestimmung des Resthämgehaltes erfolgte durch Zusatz von Mikrosomen (1 mg Eiweiß pro ml Ansatz) zu einer 0,15 N NaOH-Lösung mit 20 Vol.% Pyridin. Der so beschickte Ansatz wurde geteilt und die Meßküvette mit Natriumdithionit (1 mg pro ml Ansatz) reduziert. Dem hierdurch gebildeten Pyridinhämochromogenspektrum wurde die Extinktionsdifferenz zwischen den Wellenlängen 557 und 575 nm entnommen und der Berechnung des Anteiles des gesamten Häms zu Grunde gelegt. Der Cytochrom b_5 -Gehalt wurde aus der Extinktionsdifferenz der Wellenlängen 424 und 450 nm berechnet; der entsprechende Extinktionskoeffizient betrug $32,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für die Hämbestimmung (Omura und Sato, 1964, a) und $105 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für die Ermittlung des b_5 -Gehaltes (Mayer et al., 1968).

Das Bindungsvermögen der untersuchten Substanzen an Chlorhäm (Teichmann'sche Kristalle) wurde in einem Ansatz ermittelt, der in 1 N NaOH gelöstes Chlorhäm in 50 ml Sörensen-Phosphat-Puffer (0.067 M; pH 7,4) mit der Endkonzentration $6 \times 10^{-8} \text{ M}$ enthielt. Die Ermittlung der Schwellenkonzentration zur Hervorrufung des Pyridinhämochromogenspektrums erfolgte nach Reduktion mit Dithionit kumulativ durch Erfassung der Absorptionzunahme bei 557 nm.

Zur Titration mit CO wurden dem dithionitreduzierten Ansatz Mengen von annähernd 0,5 μl CO-gesättigten Sörensen-Phosphat-Puffers (0.067 M; pH 7,4) zugegeben und erneut im "split-beam-mode" registriert.

3. Chemikalien

Die verwendeten Substanzen waren Handelspräparate von analytischem Reinheitsgrad außer 3-(3-Pyridyl)-Propanol, 1-(2-Pyridyl)-2-(4-Pyridyl)-Äthylen und 1-(2-Pyridyl)-2-(3-Pyridyl)-Äthylen (zur Synthese). Metyrapon und reduziertes

Metyrapon waren Gaben der Firma CIBA pharmaceutical Company, Summit, N.J., USA. Chlorhämmin (Teichmann'sche Kristalle) wurde von der Firma Schuchardt, München, bezogen. Cofaktoren und Enzyme waren Präparate der Fa. Boehringer und Söhne, Mannheim. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase hatte den Reinheitsgrad II. Nicotinsäureamid, Pyridin und die Pyridinderivate wurden von der Fa. E. Merck, Darmstadt, bezogen.

4. Statistische Auswertung

Die Mittelwerte stellen das arithmetische Mittel dar. Als Streuungsmaß wurde entweder die einfache Standardabweichung (s) oder der mittlere Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) angegeben. Die Prüfung auf Unterschiede in den Mittelwerten erfolgte mittels des t-Testes nach Student für unverbundene Stichproben.

Die Berechnung wurde maschinell auf einem Wang-Rechner 700 A nach Programmen des Pharmakologischen Instituts durchgeführt.

ERGEBNISSE

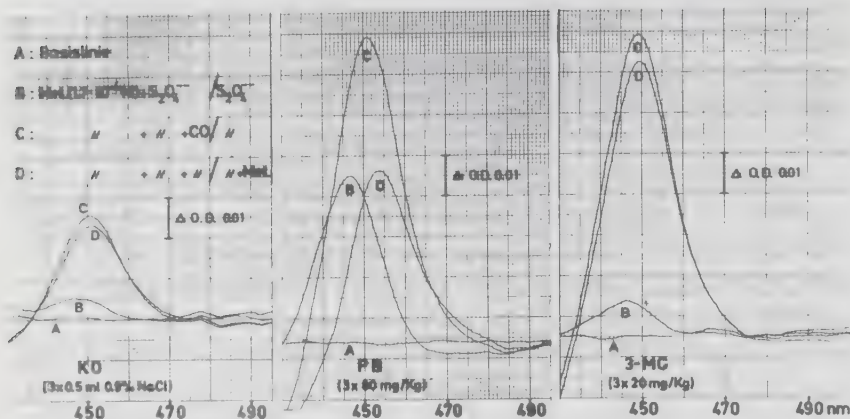
1. Verschiedene Einflußmöglichkeiten auf die Bildung des Absorptionsmaximums bei 446 nm.

a) Das metyraponbedingte Absorptionsmaximum bei 446 nm unter verschiedener Vorbehandlung.

Während wir das Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom-P-450-CO-Komplexes in 3-MC-vorbehandelten Ratten bei 449 nm beobachteten, fanden wir übereinstimmend mit Hildebrandt et al. (1969) nach Zugabe von Metyrapon zum dithionitreduzierten Ansatz ohne CO-Begasung ein Absorptionsmaximum bei 446 nm, dessen Ausmaß wir bei unterschiedlicher Vorbehandlung nachgingen. Unter allen drei Vorbehandlungsarten erscheint in Gegenwart von $1,7 \times 10^{-4}$ M Metyrapon dieses Absorptionsmaximum (Kurven B in Abb. 2). Die durch PB-Vorbehandlung im Vergleich zu Kontrolltieren um etwa den Faktor 6 gesteigerte Absorption ließ sich durch 3-MC-Vorbehandlung nicht signifikant erhöhen. Dagegen war die Zunahme des reduzierten Cytochrom-P-450-CO-Komplexes nach 3-MC- und PB-Vorbehandlung etwa gleich groß; die Absorption war etwa doppelt so groß wie in den Kontrollmikrosomen (Abb. 2, Kurven C).

Entsprechend der Versuchsanordnung bei Hildebrandt et al. (1969) wurde anschließend Metyrapon in gleicher Konzentration zur Vergleichsküvette gegeben (Abb. 2, Kurven D). Die hierbei erfolgende Verschiebung des Gipfels zum langwelligeren Bereich und die Verminderung der Absorption sind entgegen früheren Vermutungen (Hildebrandt et al., 1969) lediglich Folge des nunmehr in der Vergleichsküvette aufgetretenen Gipfels bei 446 nm, registriert im Differenzverfahren zum Gipfel bei 450 nm in der Probeküvette. Die Subtraktion der zur Grundlinie spiegelbildlich aufgetragenen Kurven B - wie es der Zunahme der Absorption in der Referenzküvette entspricht - von dem Absorptionsmaximum bei 450 nm ergibt in allen Fällen die Kurve D.

Abbildung 2: Absorptionsmaxima bei 446 und 450 nm nach verschiedener Vorbehandlung.



Die Suspension der Rattenlebermikrosomen in Sörensen-Phosphat-Puffer (0,067 M; pH 7,4) enthielt 0,33 mg Protein pro ml.

Tabelle III gibt die statistische Auswertung der Experimente wieder. Die durch Metyrapon im reduzierten Ansatz darstellbare Extinktion unterscheidet sich nach PB-Vorbehandlung hochsignifikant von derjenigen unter Kontrollbedingungen, während nach 3-MC-Vorbehandlung keine signifikante Veränderung erfolgt. Mit gleicher Signifikanz unterscheiden sich die CO-darstellbaren P-450-Maxima nach PB-, aber auch nach 3-MC-Vorbehandlung von den Kontrollmikrosomen.

Weiteren Aufschluß über die unterschiedliche Wirkung der Vorbehandlung vermittelt die Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten des Cytochrom P-450-CO-Komplexes (Tab. Hierzu wurde zunächst der Anteil an Cytochrom b_5 bestimmt und der Gesamthämgehalt ermittelt. Der als Differenz beide Komponenten als "Rest-Hämgehalt" bezeichnete Anteil wurde den gemessenen Absorptionen zu Grunde gelegt. Dies erfolgt unter der Annahme, daß das Rest-Häm dem im Cytochrom P-450 enthaltenen Häm entspricht. Die so berechneten Extinktionskoeffizienten sind nach 3-MC-Vorbehandlung annähernd um

Tabelle III: Absorption bei 446,450 und 454 nm nach unterschiedlicher Vorbehandlung.- Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm$ einfache Standardabweichung (s) dar.

	KONTROLLEN (n=9)	3-MC (n=5)	PB (n=6)
$\Delta E_{446}/\text{mg Prot.}/\text{ml}$	0.016 ± 0.006	0.018 ± 0.005	$0.117 \pm 0.032^{***}$
Maximum bei nm	446.5	445.5	446.5
$\Delta E_{454}/\text{mg Prot.}/\text{ml}$	0.085 ± 0.014	$0.190 \pm 0.061^{***}$	$0.132 \pm 0.042^{**}$
Maximum bei nm	451.5	450.0	453.0
$\Delta E_{450}/\text{mg Prot.}/\text{ml}$	0.111 ± 0.024	$0.232 \pm 0.067^{***}$	$0.220 \pm 0.048^{***}$
Maximum bei nm	451.0	449.0	451.0

* : Mittelwert unterscheidet sich gegenüber Kontrolle signifikant $p < 0,01$

***: Mittelwert unterscheidet sich gegenüber Kontrolle signifikant $p < 0,001$

Tabelle IV: Extinktionskoeffizienten von Cytochrom P-450 nach unterschiedlicher Vorbehandlung.- Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm$ einfache Standardabweichung (s) dar.

	KONTROLLEN (n=9)	3-MC (n=5)	PB (n=6)
$\Delta E_{450}/\text{mg Prot.}/\text{ml}$	0.111 ± 0.024	$0.232 \pm 0.067^{***}$	$0.220 \pm 0.048^{***}$
Rest-Häm-Gehalt ($\mu\text{Mol}/\text{mg Prot.}$)	1.41 ± 0.41	$2.14 \pm 0.25^{***}$	$3.08 \pm 1.24^{***}$
ϵ_{450} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	81.9 ± 16.9	$107.0 \pm 18.4^{**}$	76.3 ± 16.8

* : Mittelwert unterscheidet sich gegenüber Kontrolle signifikant $p < 0,05$

***: Mittelwert unterscheidet sich gegenüber Kontrolle signifikant $p < 0,01$

ein Drittel größer als nach PB-Stimulierung oder bei den Kontrolltieren. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung zu den Daten, die von Fujita und Mannering (1971) berichtet werden.

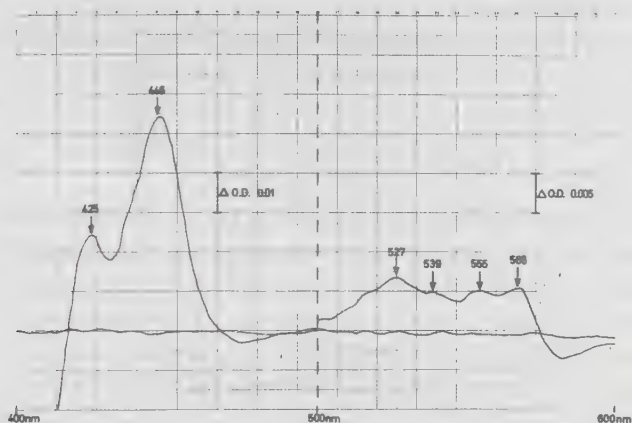
b) Entstehung eines Absorptionsmaximums bei 446 nm unter Pyridin und verschiedenen Pyridinderivaten.

Das von Hildebrandt et al. (1969) angegebene Bindungsspektrum des Metyrapons an das reduzierte Cytochrom P-450 mit seinen Absorptionsmaxima bei λ : 567 und 557 nm, 539 und 523 nm und dem beträchtlichen γ -Gipfel in der Soret-Region bei 446 nm war in ähnlicher Weise auch nach Zugabe anderer Pyridinderivate zu beobachten. Es zeigten sich jedoch Unterschiede sowohl in Bezug auf die Form des Spektrums als auch auf die Größe der Absorptionsgipfel. Abbildung 3 zeigt ein Differenzspektrum dithionitreduzierter Mikrosomen in Gegenwart von 3-(3-Pyridyl)-Propanol (10^{-2} M).

Gegenüber dem durch Metyrapon hervorgerufenen Spektrum (siehe Abb. 2) ist in der Soret-Region das Auftreten einer zweiten Bande bei 425 nm bemerkenswert, während sich im sichtbaren Bereich das Niveau der Gipfel angeglichen hat. Es scheint ein paralleles Ansteigen der Maxima bei ca. 527 und 555 nm zuungunsten der Absorption bei 567/568 und 539 nm vorzuliegen. Allgemein zeigte sich in Korrelation zum Bildungsvermögen des Gipfels bei 446 nm eine Betonung der Absorptionsmaxima bei 567 und 539 nm, -die Fähigkeit zur Ausbildung des 425 nm-Gipfels jedoch ging einher mit der verstärkten Ausprägung der Maxima bei 555 und 527 nm.

Eine Zusammenfassung der spektralen Dissoziationskonstanten, berechnet aus der Extinktionsdifferenz zwischen 446 und 490 nm bei ansteigender Ligandenkonzentration nach Eingabe verschiedener Pyridine zum dithionitreduzierten Ansatz, gibt Tabelle V. Während die K_S -Werte für Metyrapon und reduziertes Metyrapon im mikromolaren Bereich liegen, benötigt die Bindung von Pyridin und 3-(3-Pyridyl)-Propanol an das reduzierte Cytochrom P-450 wesentlich

Abbildung 3: Differenzspektrum von dithionitreduzierten Rattenlebermikrosomen in Gegenwart von 3-(3-Pyridyl)-Propanol.



Der Ansatz enthielt 1 mg Mikrosomenprotein/ml und 1 mg Natriumdithionit/ml bei einem pH von 7,8. Die Konzentration von 3-(3-Pyridyl)-Propanol war 10^{-2} M.

Tabelle V: Spektrale Dissoziationskonstanten von Pyridin und verschiedenen Pyridinderivaten in reduzierten Rattenlebermikrosomen. Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm s_{\bar{x}} \times 10^{-4}$ M dar.

	VORBEHANDLUNG mit	
	PB	3-MC
Metirapon	0.024 ± 0.003	3.9 ± 0.8
reduziertes Metirapon	0.077 ± 0.007	---
1-(2-Pyridyl)- 2-(4-Pyridyl)- Äthylen	0.570 ± 0.045	---
1-(2'-Pyridyl)- 2-(3-Pyridyl)- Äthylen	4.558 (nicht kumulativ bestimmt)	---
3-(3-Pyridyl)- Propanol	12.815 ± 2.503	11.6 ± 1.7
Pyridin	22.180 ± 4.881	45.5 ± 6.7

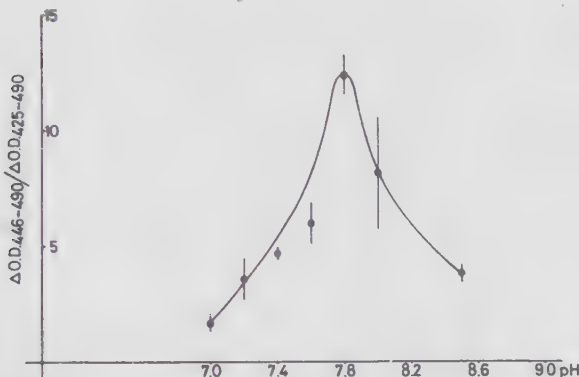
höhere Konzentrationen im millimolaren Bereich. Die Pyridyl-Äthylene nehmen in dieser Abstufung nach der Bildungsfähigkeit des Gipfels bei 446 nm eine Mittelstellung ein. In dieser Aufstellung kann nicht berücksichtigt werden, daß einige Derivate in höherer Konzentration ein dem durch Metyrapon hervorgerufenen Absorptionsmaximum durchaus gleichwertiges, zum Teil dieses übertreffendes Maximum zu bilden in der Lage sind, das heißt: eine höhere $\Delta E_{\max}$ aufweisen. Beispielhaft für ein solches Verhalten war 1-(2-Pyridyl)-2-(4-Pyridyl)-Äthylen.

Nach Vorbehandlung mit 3-MC zeigte sich für Metyrapon eine etwa um den Faktor 100 höhere Dissoziationskonstante gegenüber derjenigen für PB-stimulierte Mikrosomen (Tab.V). Darin manifestiert sich die gegenüber PB-stimulierten Mikrosomen deutlich schwächere Bindungsfähigkeit des reduzierten Cytochrom P-450 für Metyrapon. Im Gegensatz dazu wiesen die K_S für 3-(3-Pyridyl)-Propanol und Pyridin nach 3-MC-Vorbehandlung gegenüber der PB-Vorbehandlung geringere Unterschiede auf (Tab.V).

c) pH-Abhängigkeit des Verhältnisses des Absorptionsmaximums bei 446 nm zum Absorptionsmaximum bei ca. 425 nm im durch 3-(3-Pyridyl)-Propanol hervorgerufenen Spektrum.

Der Untersuchung der pH-Abhängigkeit liegt die Vorstellung zu Grunde, daß sich die zwei Gipfel im Soret-Bereich in einem Gleichgewicht befinden, welches von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig ist. Dieser Überlegung nachgehend, untersuchten wir das Verhältnis der Absorptionen bei den Wellenlängen 446 zu 425 nm unter 3-(3-Pyridyl)-Propanol (10^{-2} M) an PB-stimulierten Mikrosomen (Abb.4). Offensichtlich ist die Ausbildung des Gipfels bei 446 nm bei pH 7,8 am stärksten, während sie bei Senkung oder Steigerung des pH wieder abnimmt. Entsprechend ist der Zuwachs des 425 nm-Gipfels bei sehr saurem oder sehr alkalischem Milieu. Die relativ große Streuung bei pH 8 in unseren Versuchen mag ihre Ursache zum Teil darin finden, daß dort der Sörensen-Phosphat-Puffer am Ende und der Glycin-Puffer am Beginn seiner Pufferkapazität steht.

Abbildung 4:Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Verhältnis der Absorptionsmaxima bei 446 und 425 nm im 3-(3-Pyridyl)-Propanol-bedingten Differenzspektrum reduzierter Mikrosomen.-Mittelwert und Standardfehler-

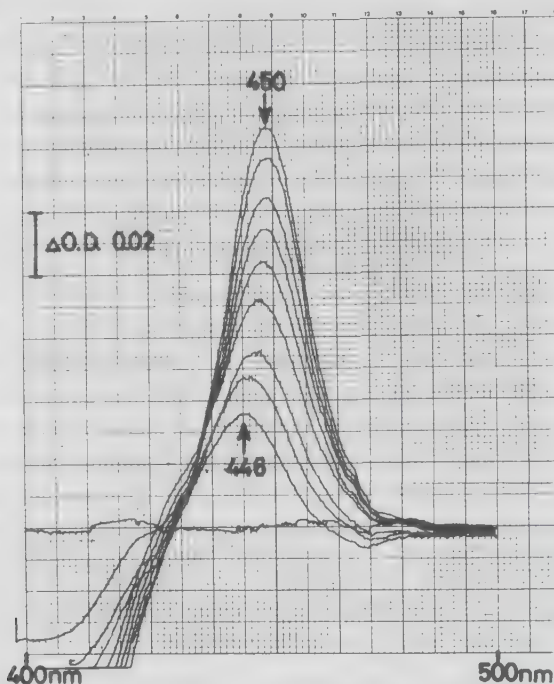


Der Ansatz enthielt 1 mg Mikrosomenprotein/ml Sörensens-Phosphat-Puffer für den pH-Bereich 7.0 bis 8.0, bzw. Glycin-Puffer für den pH-Bereich 8.0 bis 8.6. Die Reduktion erfolgte mit 1 mg Natriumdithionit/ml; die Konzentration von 3-(3-Pyridyl)-Propanol betrug 10^{-2} M. Induktion mit Phenobarbital.

d) Bildung des Absorptionsmaximums bei 450 nm aus dem Absorptionsmaximum bei 446 nm durch sukzessive Zugabe CO-gesättigten Puffers.

Eine sukzessive Zugabe CO-gesättigten Puffers zum durch Metyrapon hervorgerufenen Differenzspektrum des dithionit-reduzierten Ansatzes führt zu einer Verschiebung des metyraponbedingten 446 nm-Gipfels zum CO-bedingten 450 nm-Gipfel (Abb.5). Auch die Zunahme der Absorption weist auf das Vorliegen des charakteristischen CO-Komplexes des reduzierten Cytochrom P-450 hin. Auch unter Berücksichtigung des Verdünnungseffektes bleibt die Absorptionshöhe bei 450 nm nach maximaler CO-Puffer-Zugabe unter dem entsprechenden Wert ohne Anwesenheit von Metyrapon.

Abbildung 5: Verschiebung des metyraponbedingten Differenzspektrums nach sukzessiver Zugabe von Kohlenmonoxid.



Nach Zugabe von Metyrapon (10^{-4} M) zur Probeküvette der dithionitreduzierten Mikrosomensuspension ergibt sich im Differenzspektrum die unterste Kurve (Max. 446 nm). Nach sukzessiver Zugabe von ca. 0,5 μ l CO-gesättigten Sörensen Phosphat-Puffers wurde wiederholt das Differenzspektrum registriert und die folgenden Kurven - in der zeitlichen Folge von unten nach oben - erhalten. **Induktion mit Phenobarbital.**

2. Vergleichende Untersuchungen auf ähnliches Verhalten von Metyrapon und einigen Pyridinen.

a) Stoffwechselhemmende Wirkung.

Die O-Demethylierung von p-Nitroanisol diente schon frühe (Netter et al., 1969) als Modellreaktion, um den inhibitorischen Effekt von Metyrapon und reduziertem Metyrapon auf den Arzneimittelstoffwechsel nachzuweisen. Alle untersuch

Pyridine wiesen ebenfalls einen Hemmeffekt auf die pNA-Demethylierung auf (Tab.VI).Metyrapon als der stärkste Hemmstoff bewirkt eine 50%-Hemmung schon in einer Konzentration von 2-4 μM in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.Um zwei Größenordnungen höher liegen die erforderlichen Konzentrationen einer vergleichbaren Hemmung für Pyridin,das sich damit als schwächster Inhibitor erweist.Die Reihenfolge der untersuchten Substanzen nach ihrem Vermögen,die pNA-Demethylierung zu beeinträchtigen,steht mit einer Ausnahme in guter Übereinstimmung mit der Reihenfolge,die sich auf Grund der spektralen Dissoziationskonstanten (siehe Tab.V) ergibt.

Tabelle VI:Hemmung der p-Nitroanisol-Demethylierung durch einige Pyridinderivate in phenobarbitalstimulierten Rattenlebermikrosomen.Die Werte $\times 10^{-5}$ M stellen die Inhibitorkonzentration bei 50%-iger Hemmung dar.

	KONZENTRATION von p-NITROANISOL		
	5×10^{-5} M	10^{-4} M	2×10^{-4} M
Metyrapon	0.2	0.3	0.4
reduziertes Metyrapon	0.9	1.6	3.2
1-(2-Pyridyl)- 2-(4-Pyridyl)- Äthylen	1.5	1.9	4.0
3-(3-Pyridyl)- Propanol	2.9	3.4	3.9
1-(2-Pyridyl)- 2-(3-Pyridyl)- Äthylen	10.0	13.3	19.4
Pyridin	15.0	18.2	20.8

b) Bildung von Pyridinhämochromogenspektren

Wir konnten die Bildung von Hämochromogenspektren durch alle getesteten Substanzen am dithionitreduzierten Hämin (Teichmann'sche Kristalle) nachweisen. Alle Reagentien zeigten die typischen Banden bei 557 und 526/527 nm sowie in der Soret-Region. Tabelle VII gibt eine Zusammenfassung der Bereiche der Schwellenkonzentrationen der getesteten Substanzen wieder, bei der die Bildung des Pyridinhämochromogenspektrums bei 557 nm registriert werden konnte. Spektrale Dissoziationskonstanten wurden nicht ermittelt, so daß unterschiedliche molare Extinktionskoeffizienten der Liganden möglicherweise von Bedeutung sind. Derartige Unterschiede dürften jedoch die Reihenfolge hinsichtlich des Bindungsvermögens der Liganden, die sich aus Tabelle VI ergibt, nicht wesentlich beeinflussen. In Übereinstimmung mit den spektralen Dissoziationskonstanten gegenüber P-450 (Tab. V) liegt die Affinität der Liganden gegenüber dem Hämolekül für Metyrapon und reduziertes Metyrapon mindestens eine Zehnerpotenz höher.

Tabelle VII: Schwellenkonzentration zur Hervorrufung des Pyridinhämochromogenspektrums durch Pyridinderivate.

Metyrapon	$10^{-7} - 10^{-6}$
reduziertes Metyrapon	$10^{-7} - 10^{-6}$
1-(2-Pyridyl)-2-(4-Pyridyl)-Äthylen	$10^{-6} - 10^{-5}$
1-(2-Pyridyl)-2-(3-Pyridyl)-Äthylen	$10^{-5} - 5 \times 10^{-5}$
3-(3-Pyridyl)-Propanol	$10^{-4} - 5 \times 10^{-4}$
Pyridin	$10^{-3} - 10^{-2}$

Die Werte stellen den Bereich der Schwellenkonzentration des Liganden in Mol/l, gemessen bei 557 nm, dar.

DISKUSSION

1. Ein oder zwei Cytochrome ?

Das in den Lebermikrosomen enthaltene Cytochrom P-450 dient einer großen Anzahl von verschiedenartigen Reaktionen als die sauerstoffaktivierende Endoxydase. Wegen der unübersehbaren Vielfalt der betroffenen Substratmoleküle hinsichtlich ihrer Größe und ihrer Form sowie der Unterschiedlichkeit ihrer funktionellen Gruppen, fällt es schwer, die mischfunktionelle Oxydase nur als einziges Enzym anzusehen (Schenkman, 1970).

Die Frage nach zwei Cytochromen läßt sich einmal begründen durch die unterschiedliche Induzierbarkeit der Bestandteile des arzneimitteloxydierenden Systems in den Mikrosomen durch verschiedene Substrate (siehe Tab. II und Einleitung) (Sladek und Mannering, 1969; Hildebrandt et al., 1968). Dieser Punkt soll hier unter dem Aspekt des unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten des Cytochrom P-450-CO-Komplexes besprochen werden.

Weiterhin wies der biphasische Verlauf der P-450-Reduktion auf zwei induzierbare Formen hin (Levin und Kuntzman, 1969). Bei dieser Reduktion von Cytochrom P-450 durch NADPH läßt sich ein erster schneller Teil durch Typ I-Substrate beschleunigen; der zweite langsame Teil kann durch Elektronen-Transport-Partikel gesenkt werden (Gigon et al., 1969).

Endlich warfen auch die unterschiedlichen Bindungen von Typ I- und Typ II-Substraten an das Cytochrom P-450 nach PB- und 3-MC-Behandlung die Frage nach zwei Cytochromen oder zwei ineinander umwandelbaren Formen auf. Denn es zeigte sich, daß die erforderliche Substratkonzentration zur Hervorrufung eines Bindungsspektrums je nach Vorbehandlung ungleich groß war (Imai und Siekewitz, 1971). Der Einfluß der Vorbehandlung endlich auf das metyraponbedingte Absorptionsmaximum bei 446 nm in reduzierten M^{11} -osomen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Ob die zweigipflige Soret-Bande und ihre pH-Abhängigkeit

unter EtNC (Imai und Sato, 1966, b; Sladek und Mannering, 1966) die These zweier Cytochrome, die sich im pH-abhängigen Gleichgewicht befinden, rechtfertigt, erscheint dagegen zweifelhaft und soll hier ebenso diskutiert werden, wie die von Hildebrandt et al. (1969) postulierte selektive Darstellung zweier Cytochromformen durch Metyrapon.

a) Extinktionskoeffizienten des CO-Komplexes des reduzierten Cytochrom P-450 nach PB- und 3-MC-Stimulierung.

Omura und Sato gaben 1964 als Extinktionskoeffizienten des CO-Komplexes mit dem dithionitreduzierten P-450 $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ an. Hildebrandt et al. (1968) sahen in diesem Wert die Manifestierung zweier Koeffizienten bei den Mikrosomen der unbehandelten Tiere. Durch PB- bzw. 3-MC-Behandlung wurden diese Formen isoliert bei Kaninchen erhalten und die Werte $50 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nach PB und $218 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nach 3-MC gefunden. Dagegen fanden Greene et al. (1971) bei derselben Species keine Unterschiede nach Vorbehandlung, wenn sie den P-450-Gehalt auf Grund der Subtraktion des Cytochrom b_5 -Gehaltes vom Gesamt-Hämgehalt berechneten. Eine Kalkulation auf Grund der Messung des Umwandlungsproduktes Cytochrom P-420 ergab für die PB-Behandlung einen höheren millimolaren Extinktionskoeffizienten (122) als für 3-MC-Stimulierung (100). Bei Ratten erhielten die Autoren Werte, die den unsrigen gut vergleichbar sind und ebenfalls mit der Bestimmungsmethode des Rest-Hämgehaltes nach Abzug des Cytochrom b_5 -Anteiles gewonnen wurden: um $85 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei Kontrolltieren und nach PB-Vorbehandlung gegenüber 81,9 bzw. 76,3 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in unseren Versuchen; nach 3-MC-Vorbehandlung erhöhte sich dieser Wert auf $102 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ - wir erhielten $107 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Auch bei Fujita und Mannering (1971) sind die millimolaren Extinktionskoeffizienten für 3-MC-behandelte Mikrosomen signifikant höher (108,0) als nach PB-Behandlung oder bei Kontrolltieren (89,1). Die von uns ermittelte geringfügige Veränderung nach PB-Behandlung gegenüber den Kontrolltieren gibt einen Hinweis darauf, daß die PB-Induktion

keine Veränderungen qualitativer Art hervorruft, während 3-MC zumindest einen verändernden Einfluß auf diesen Parameter hat und damit die These der Synthese eines neuen Cytochroms stärkt.

Jede Ableitung zweier Cytochromformen aus den unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten bleibt jedoch eine Annäherung, da ein "reiner" Extinktionskoeffizient so lange nicht angegeben werden kann, wie die Möglichkeit einer Beeinflussung durch noch unbekannte, ebenfalls in den Mikrosomen vorhandene und stimulierte Cytochromformen besteht, auch wenn diese Stimulierung nur ein geringes Ausmaß besitzt. Nur die Isolierung jeder einzelnen Cytochromform wird die nötige Klarheit verschaffen können.

Die geringe Linksverschiebung des Gipfels im Differenzspektrum nach Bildung des CO-Komplexes mit dem reduzierten Cytochrom von 450 auf 449 nm, verschiedentlich auch bei 448 nm beschrieben (Alvares et al., 1967; Fujita und Mannering, 1971; Greene et al., 1971), scheint nur ein Beispiel einer generellen Wirkung der 3-MC-Induktion zu sein. So beobachteten wir eine ähnliche Linksverschiebung des metyraponbedingten 446 nm-Gipfels um 1 nm. Imai und Siekewitz (1971) fanden eine vergleichbare Verschiebung des EtNC-bedingten 455 nm-Maximums unter 3-MC-Behandlung auf 453/452 nm.

EPR-Studien (Peisach und Blumberg, 1970) sowie Deutungen der Absolutspektren nach beiden Induktionsarten (Jefcoate und Gaylor, 1969; Hildebrandt et al., 1968) lassen auf zwei Formen des Cytochrom P-450 schließen, von denen eine nach PB-Induktion in der low spin-Form vorliegt, die andere nach 3-MC-Verabreichung aber in der high spin-Form (Hildebrandt et al., 1968). Da andererseits die Möglichkeit besteht, durch Typ I-Substrate das bestehende Gleichgewicht der beiden Resonanztypen zugunsten der high spin-Form zu verschieben, während Typ II-Substrate die low spin-Form hervorzurufen scheinen (Williams, 1967; Cammer et al., 1966),

wäre es denkbar, daß die Induktion mit 3-MC eine Veränderung des Proteinanteiles des Cytochroms bewirkt, die einer Substratbindung vergleichbar ist (Imai und Siekevitz, 1970).

Für einen Effekt des 3-MC auf den Lipidgehalt oder die Lipidzusammensetzung des Cytochroms (Imai und Siekevitz, 1970) spricht die Abnahme der Typ I-Bindungsfähigkeit, die ja eine Konsequenz lipophiler Bindungskräfte sein kann (Schenkman et al., 1967, a; Ullrich, 1969), nach 3-MC-Induktion (Shoeman et al., 1969).

Schwierigkeiten bereitet in diesem Zusammenhang unser Befund, daß die Bindung von Metyrapon an das reduzierte Cytochrom P-450 nach 3-MC-Stimulierung im Gegensatz zu der Metyrapon-Bindung nach PB-Induktion kaum gesteigert ist. Die von Shoeman et al. (1969) gefundene Zunahme der Bindung von Typ II-Substraten nach Verabfolgung polyzyklischer Kohlenwasserstoffe ist offenbar auf das oxydative Bindungsspektrum beschränkt.

b) "P-446" und "P-454".

Auf Grund der Fähigkeit des Metyrapon, mit dem reduzierten Cytochrom P-450 eine Bindung einzugehen, die sich im Differenzspektrum als Absorptionsmaximum bei 446 nm äußert, schlossen Hildebrandt et al. (1969) - wie in der Einleitung ausgeführt - auf die Darstellbarkeit einer Cytochromform, die vergleichbar zur 3-MC-induzierten Form mit ihrem Absorptionsmaximum bei 448 nm erschien; eine zweite Form würde nach CO-Begasung der Probeküvette und Eingabe von Metyrapon in die Vergleichsküvette durch ein Absorptionsmaximum bei 454 nm sichtbar. Wie CO sollte Metyrapon die Funktionsfähigkeit der "P-446"-Form verhindern und durch vermehrten Elektronenfluß zum Cytochrom "P-454" den Stoffwechsel der Typ II-Substrate verstärken, während das für Typ I-Hydroxylierung verantwortliche Cytochrom "P-446" gehemmt würde.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Bildung

des 446 nm-Gipfels keine spezifische Eigenschaft des Metyrapon oder des reduzierten Metyrapon ist, sondern durch alle untersuchten Pyridinderivate hervorruft. Die Zuordnung der Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich bei 523 und 557 nm zu der Bildung von Pyridinhämochromogenen wurde schon von Hildebrandt et al. (1969) diskutiert und scheint durch einen Vergleich der Hämochromogen-Bildungsfähigkeit aller untersuchten Substanzen mit Chlorhäm (Teichmann'sche Kristalle) gesichert. Die auffällige parallele Zunahme dieser beiden Absorptionsmaxima mit verminderter 446-Peak-Bildung und vermehrter Extinktion bei 425 nm unter verschiedenen Bedingungen weist auf das Vermögen der mikrosomalen Hämoproteine zur Bildung von Pyridinhämochromogenen hin, wobei nicht unterschieden werden kann, ob Cytochrom P-450 oder Cytochrom b_5 den Bindungspartner darstellt. Die beiden anderen Maxima im langwelligen Bereich bei 539 und 567 nm wurden von Hildebrandt et al. (1969) als Symptom einer Bindung nach Art der Cyanid-Hämochrome gedeutet. Cyanid bildet mit Protohäm α - und β -Banden bei 540 und 570 nm (aus: Hill et al., 1970). Ebenfalls in diesem Bereich liegen die Absorptionsgipfel des oxydierten Cytochrom P-450 im Absolutspektrum. In diesem Zusammenhang ist eine weitere Beobachtung recht aufschlußreich: nach Alterung der Mikrosomen - ähnlich auch nach Eiweißdenaturierung durch Kochen der Suspension - bewirkte Metyrapon nur geringe Absorptionzzunahme bei 568 und 539 nm, wenn es zum reduzierten Ansatz hinzugegeben wurde. Die Bedeutung der Alterung der Mikrosomen zeigt auch die Beobachtung von Imai und Siekevitz (1971), daß bei 3-MC-vorbehandelten Mikrosomen im EtNC-bedingten Spektrum nach 15 Minuten Alterung die Absorption bei 437 nm zunahm - der 430 nm-Gipfel hingegen abnahm.

Eine Zusammenfassung aller Befunde und Deutungen der Bindung des Metyrapon an das reduzierte Cytochrom P-450 zeigt einen Fächer von Wirkungen: die Bildung des 446 nm-

Gipfels ist vergleichbar mit der CO-Wirkung, die Maxima bei 523 und 557 nm entsprechen dem Pyridincharakter, in den Maxima bei 539 und 567/568 nm wird ein cyanidartiger Effekt diskutiert.

Ob durch dieses spektrale Verhalten der Nachweis zweier Cytochrome geführt werden kann, erscheint zweifelhaft, da sich alle Erscheinungen auf Bindungscharakteristiken eines Hämoproteins zurückführen lassen. Auch die Bildung des 454 nm-Gipfels erscheint nicht als hinreichender Anlaß, auf eine neue Cytochromform zu schließen, da sich durch Zugabe von Metyrapon zur Vergleichsküvette ein 446 nm-Maximum bildet, welches im Differenzspektrum eine spiegelbildliche Registrierung erfährt - also mit einem Minimum bei 446 nm kalkuliert werden muß - so daß die Summation zum vorhandenen Absorptionsmaximum bei 450 nm nach CO-Begasung der Probeküvette eine durchaus erschöpfende Erklärung des 454 nm-Gipfels liefert.

c) pH-Abhängigkeit der zweigipfligen Soret-Banden.

Die unter Pyridinderivaten beobachtete Doppelgipfligkeit im Soret-Bereich ist vergleichbar mit den durch EtNC hervorgerufenen Absorptionsmaxima bei 430 und 455 nm (Imai und Sato, 1967, b; Ichikawa und Yamano, 1967; Fujita et al., 1963). Jefcoate und Gaylor (1969) fanden ähnliche Spektren für n-Oktylamin. Auch Anilin und das auch von uns untersuchte Pyridin verursachen eine Abnahme der Lichtdurchlässigkeit bei 425 und 446 nm (Imai und Sato, 1967).

Allen diesen spektralen Veränderungen ist eine starke pH-Abhängigkeit eigen. Während Imai und Sato (1967) ein maximales Verhältnis des 455 nm- zum 430 nm-Gipfel bei pH 8,0 fanden, lag die optimale Bedingung für das Verhältnis der 446 nm- zur 425 nm-Extinktion unter 3-(3-Pyridyl)-Propanol bei dem pH-Wert 7,8; dieses Verhältnis nahm wieder ab, wenn das Milieu noch alkalischer gewählt wurde (siehe Abb. 4). Bei einer Steigerung des pH-Wertes über pH 8,0 ist

nach Imai und Sato (1967) eine Umwandlung zum Cytochrom P-420 zu berücksichtigen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch die von uns ermittelten Werte über pH 8,0 von dieser Umwandlung betroffen werden.

Versuche von Ichikawa und Yamano (1968) mit Isocyaniden unterschiedlicher Kettenlänge zeigen eine Vergrößerung des 455 nm-Gipfels entsprechend der Anzahl der Methylgruppen, verbunden mit einer gleichsinnigen Abnahme des 430 nm-Gipfels. Auch die Begünstigung des 455 nm-Gipfels nach 3-MC-Behandlung (Alvares et al., 1967) läßt neben der pH-Abhängigkeit andere Einflußmöglichkeiten auf das Verhältnis der spektralen Erscheinungen wirksam werden.

Hinsichtlich der spektralen Veränderungen nach 3-MC-Vorbehandlung unterscheiden sich die Pyridinderivate wesentlich von den Isocyaniden: unter Pyridinderivaten erfolgt *k e i n e* Zunahme des 450 nm-nahen Gipfels bei 446 nm und eine relative Zunahme des Gipfels bei 425 nm gegenüber dem Absorptionsmaximum bei 446 nm.

Die Bildung einer ebenfalls zweigipfligen Soret-Bande durch Piperonyl-Butoxid mit - durch NADPH reduziertem - Cytochrom P-450 (Philpot und Hodgson, 1971) zeigt, daß auch Typ I-Substrate zur Ausbildung dieser spektralen Eigenart befähigt sein können.

2. Korrelation zwischen Bindungs-, Michaelis- und Hemmkonstanten.

Versuche einer Korrelierung der spektralen Dissoziationskonstante K_S einer Substanz an das oxydierte Cytochrom P-450 in Form eines Typ I- oder Typ II-Spektrums mit deren Stoffwechsel- (K_M) oder mit ihrer inhibitorischen Wirkung (K_I) zeigen recht unterschiedliche Ergebnisse. Da Substanzen gebunden werden können, ohne in besonderem Ausmaß durch das Cytochrom P-450 metabolisiert zu werden - man denke an den Cytochrom P-450-unabhängigen reduktiven Stoffwechsel des Metyrapon als Hauptstoffwechselweg und

die hohe Bindungsaffinität zum Cytochrom P-450 - umgekehrt aber auch Substanzen der mischfunktionellen Oxygenierung unterliegen, ohne ein Bindungsspektrum zu bilden (Mannering, 1971, b), erscheint die Bindung an das Cytochrom P-450 im oxydierten Zustand kaum als der geeignete Parameter zur Voraussage der Hydroxylierungsgeschwindigkeit dieser Substanz. Kratz und Staudinger (1968) fanden beispielsweise eine 100-fach größere K_S für die Bindung von Coumarin (Typ I) an Cytochrom P-450 als die Michaeliskonstante für die Coumarinhydroxylierung. Für Anilin werden umgekehrte Befunde mitgeteilt: $K_M/K_S = 10/1$ (Schenkman et al., 1967, b). Dagegen war die Zunahme beider Konstanten (K_M und K_S) nach PB-Behandlung für Cyclohexan gleich groß (Ullrich, 1969). Degkwitz et al. (1969) sahen eine strenge Analogie zwischen der optischen Dichte der substratgebundenen Mikrosomen und der spezifischen Stoffwechselaktivität, während Bohn et al. (1971) keine Korrelation zwischen N-Demethylierung und Substratbindungsspektrum fanden.

Nach den vorliegenden Befunden zeigt sich keine sichere Beziehung zwischen Bindungskonstante und der Stoffwechselgeschwindigkeit einer Substanz. Es stellt sich die Frage einer Korrelation zwischen Bindung und Hemmwirkung der Pyridinderivate. In diesem Fall ist eine Bindungsstelle am Hämeisen besetzt und diese Bindung erklärt möglicherweise die inhibitorische Wirkung. Unter diesem Gesichtspunkt gewinnt besonders die Bindung von Substanzen an das reduzierte Cytochrom P-450 eine Bedeutung. Den engen Bezug zwischen Bindung an das reduzierte Cytochrom und Stoffwechsel macht der Befund von Sies und Brauser (1970) deutlich, nach dem auch Hexobarbital eine Bindung an das reduzierte Cytochrom eingeht, die nach Metabolisierung nicht mehr auffindbar ist.

Die in dieser Arbeit gefundene Korrelation der Reihenfolge der Pyridinderivate bezüglich ihrer spektralen Dissoziations

konstante und deren Hemmeffekt auf die p-Nitroanisol-Demethylierung gibt einen Hinweis darauf, daß die Abhängigkeit der Hemmaktivität der Substanzen von ihrem Bindungsspektrum enger erscheint bei Berücksichtigung der Bindung an reduziertes Cytochrom als bei der Beurteilung ihres oxydativen Bindungsspektrums.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß das Absorptionsmaximum bei 446 nm in dithionitreduzierten Rattenlebermikrosomen, welches die Bindung von Metyrapon an das reduzierte Cytochrom P-450 anzeigt, auch durch das an der Ketogruppe reduzierte Metyrapon und durch eine Reihe weiterer Pyridinderivate (1-(2-Pyridyl)-2-(4-Pyridyl)-Äthylen, 1-(2-Pyridyl)-2-(3-Pyridyl)-Äthylen, 3-(3-Pyridyl)-Propanol und Pyridin selbst) hervorgerufen werden kann. Die Affinität des reduzierten Cytochrom P-450 für diese Substanzen ist jedoch geringer als die für Metyrapon und reduziertes Metyrapon. Hierbei zeigt Metyrapon mit einer Dissoziationskonstante - bezogen auf das Absorptionsmaximum bei 446 nm - von $2,4 \mu\text{M}$ das größte Bindungsvermögen, während Pyridin mit einer K_S von $2,2 \times 10^{-3} \text{ M}$ die geringste Affinität aufweist.

Während das metyraponbedingte Spektrum durch fünf Banden gekennzeichnet ist und kein Absorptionsmaximum bei 425 nm aufweist, verursachen die übrigen getesteten Pyridinabkömmlinge einschließlich des reduzierten Metyrapons ein sechsbandiges Spektrum mit zwei Soretbanden bei 425 und 446 nm, zwei beta-Banden bei 527 und 539 nm sowie zwei alpha-Banden bei 555 und 568 nm. Die Banden bei 539 und 568 nm ließen sich am deutlichsten durch Metyrapon hervorrufen und waren durch die anderen Pyridinderivate nur in sehr viel geringerem Ausmaß zu erzeugen.

Die für ein Hämoprotein atypischen Banden bei 446, 539 und 568 nm zeigten eine erhebliche Empfindlichkeit gegenüber Alterungsvorgängen und traten unter diesen Umständen allmählich hinter den für ein Pyridinhämochromogen typischen Banden bei 425, 527 und 555 nm zurück. Auch bei Verschiebung eines optimalen pH-Wertes von 7,8 ins Saure oder Alkalische nahm die Absorption bei 446 nm ab.

Bei sukzessiver Zugabe kleiner Volumina eines kohlenmonoxidgesättigten Puffers wurde das Maximum bei 446 nm

allmählich zum langwelligen Bereich hin verschoben und nahm zu, bis schließlich das typische Spektrum des Kohlenmonoxidkomplexes mit dem reduzierten Cytochrom P-450 erreicht war.

Ein Vergleich der Hemmwirkung der untersuchten Pyridinderivate auf die O-Demethylierung von p-Nitroanisol in phenobarbitalstimulierten Rattenlebermikrosomen erweist Metyrapon mit einer 50%-Hemmung von 4×10^{-6} M als den stärksten Inhibitor dieser Reaktion. Reduziertes Metyrapon ($3,2 \times 10^{-5}$ M), 3-(3-Pyridyl)-Propanol ($3,9 \times 10^{-5}$ M) und nach den beiden Äthylenen schließlich Pyridin ($2,1 \times 10^{-4}$ M) zeigten eine zunehmend schwächere Hemmung. Die Korrelation der spektralen Bindungskonstante gegenüber dem reduzierten Cytochrom P-450 mit der inhibitorischen Potenz wird diskutiert.

Die spektrale Dissoziationskonstante für Metyrapon ist in phenobarbitalstimulierten Mikrosomen mit $2,4 \mu\text{M}$ etwa 100-fach kleiner als in methylcholanthrenstimulierten Mikrosomen ($3,9 \times 10^{-4}$ M). Die mögliche Bedeutung der unterschiedlichen Induzierbarkeit des metyraponbedingten Absorptionsmaximums bei 446 nm für das Problem mehrerer Cytochrom P-450-Formen wird ebenfalls diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS
=====

- ALVARES, A.P., G.SCHILLING, W.LEVIN and R.KUNTZMAN: Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. Biochem.biophys.Res.Comm. 29, 521 (1967)
- ALVARES, A.P., G.SCHILLING, W.LEVIN and R.KUNTZMAN: Alteration of the microsomal hemoprotein by 3-methylcholanthrene: effect of ethionine and actinomycin D. J.Pharmacol. Exper.Therap. 163, 417 (1968)
- ANDERS, M.W.: Acetone enhancement of microsomal aniline parahydroxylase activity. Archs Biochem.Biophys. 126, 269 (1968)
- ARCOS, J.C., A.H.CONNEY and N.P.BUU-HOI: Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular sizes. J.Biol. Chem. 236, 1291 (1961)
- AXELROD, J.: The enzymatic conversion of codeine to morphine. J.Pharmacol.Exper.Therap. 115, 259 (1955)
- BARGMANN, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964, S.45
- BARON, J. and T.R.TEPHLY: Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on the stimulation of hepatic microsomal heme synthesis and induction of hepatic microsomal oxidases produced by phenobarbital. Molec.Pharmacol. 5, 10 (1969)
- BIDLEMAN, K. and G.J.MANNERING: Induction of drug metabolism. V. Independent formation of cytochromes P-450 and P₁-450 in rats treated with phenobarbital and 3-methylcholanthrene simultaneously. Molec.Pharmacol. 6, 697 (1970)
- BLUNCK, W. und J.R.BIERICH: Differenzierte Auswertung des Metopirontests durch Dünnschichtchromatographie. Klin.Wschr. 46, 202 (1968)

- BOHN, W., V. ULLRICH and H. J. STAUDINGER: Species of cytochrome P-450 in rat liver microsomes with different stereoselectivity for the binding and monooxygenation of (+)- and (-)-methylphenobarbital. Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol. 270, 41 (1971)
- BRESNICK, E. and H. MOSSÉ: Activation of genetic transcription in rat liver chromatin by 3-methylcholanthrene. Molec. Pharmacol. 5, 219 (1969)
- BRODIE, B. B. and J. AXELROD: The fate of acetanilide in man. J. Pharmacol. Exper. Therap. 94, 29 (1948)
- BRODIE, B. B., J. J. BURNS, L. C. MARLE, P. A. LIEF, E. BERNSTEIN and E. M. PAPPER: The fate of pentobarbital in man and dog and a method for its estimation in biological materials. J. Pharmacol. Exper. Therap. 109, 26 (1953)
- BRODIE, B. B., J. R. GILLETTE and B. N. LADU: Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. Annual Rev. Biochem. 27, 427 (1958)
- BROWN, R. R., J. A. MILLER and E. C. MILLER: The metabolism of methylated aminoazo dyes. IV. Dietary factors enhancing demethylation in vitro. J. Biol. Chem. 209, 211 (1954)
- CAMMER, W., J. B. SCHENKMAN and R. W. ESTABROOK: EPR measurements of substrate interaction with cytochrome P-450. Biochem. biophys. Res. Commun. 23, 264 (1966)
- CHART, J. J. and H. J. SHEPPARD: Pharmacology and biochemistry of some amphenone analogues and other adrenal cortical inhibitors. J. med. pharm. Chem. 1, 407 (1959)
- CLAUDE, A.: Proc. Soc. exp. biol. Med. 39, 398 (1938); zit. nach CLAUDE, A.: Microsomes, endoplasmatic reticulum and interactions of cytoplasmic membranes. In: GILLETTE, J. R., A. H. CONNEY, G. J. COSMIDES, R. W. ESTABROOK, J. R. FOUTS and

- G.J.MANNERING;(Eds.):Microsomes and drug oxidations.
Academic Press,New York,London 1969
- COHEN,B.S. and R.W.ESTABROOK: Microsomal electron transport reactions.I.Interaction of reduced triphosphopyridine nucleotide during the oxidative demethylation of aminopyrine and cytochrome b_5 reduction.Archs Biochem. Biophys. 143, 37 (1971,a)
- COHEN,B.S. and R.W.ESTABROOK: Microsomal electron transport reactions.II.The use of reduced triphosphopyridine nucleotide and/or reduced diphosphopyridine nucleotide for the oxidative N-demethylation of aminopyrine and other drug substrates. Archs Biochem.Biophys. 143, 46 (1971,b)
- COLBY,H.D. and A.C.BROWNIE: A comparison of the effects produced by metyrapone and its reduced metabolite on the adrenal 11β -hydroxylase system in the rat. Steroids 16, 401 (1970)
- CONNEY,A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. Pharmacol.Rev. 19, 317 (1967)
- CONNEY,A.H. and A.G.GILMAN: Puromycin inhibition of enzyme induction by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. J.Biol.Chem. 238, 3682 (1963)
- CONNEY,A.H.,E.C.MILLER and J.A.MILLER: The metabolism of methylated aminoazo dyes.V.Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. Cancer Res. 16, 450 (1956)
- CONNEY,A.H.,E.C.MILLER and J.A.MILLER: Substrate-induced synthesis and other properties of benzpyrene hydroxylase in rat liver. J.Biol.Chem. 228, 753 (1957)

- COOPER, D.Y., S.LEVIN, S.NARASIMHULU, O.ROSENTHAL and R.W.
ESTABROOK: Photochemical action spectrum of the
terminal oxidase of mixed function oxidase systems.
Science 147, 400 (1965)
- DALLNER, G., P.SIEKEVITZ and G.E.PALADE: Biogenesis of
endoplasmic reticulum membrane. II. Synthesis of
consecutive microsomal enzymes in developing rat
hepatocyte. *J.cell.Biol.* 30, 97 (1966)
- DAS, M.L., S.ORRENIUS and L.ERNSTER: On the fatty acid and
hydrocarbon hydroxylation in rat liver microsomes.
Europ.J.Biochem. 4, 519 (1968)
- DEGKWITZ, E., V.ULLRICH, H.J.STAUDINGER and W.RUMMEL: Metabolism
and cytochrome P-450 binding spectra of (+)- and (-)-
hexobarbital in rat liver microsomes. *Hoppe-Seyler's
Zschr.physiol.Chem.* 350, 547 (1969)
- DEXTER, R.N., L.M.FISHMAN, R.L.NEY and G.W.LIDDLE: Inhibition
of adrenal corticosteroid synthesis by amino-
glutethimide: studies of the mechanism of action.
J.clin.Endocr. 27, 473 (1967)
- ECKLER, E., J.R.BIERICH und D.SCHÖNBERG: Die Prüfung der
corticotropen Funktion der Hypophyse mit Metopiron.
II. Untersuchungen nach Behandlung mit Corticosteroiden.
Endokrinologie 42, 321 (1962)
- ERICKSON, R.E., R.J.ERTEL and F.UNGAR: Effect of Su-4885 on
steroid 18-hydroxylation in the mouse adrenal in vitro.
Endocrinology 78, 343 (1966)
- ERNSTER, L. and S.ORRENIUS: Substrate-induced synthesis of
the hydroxylating enzyme system of liver microsomes.
Fed.Proc. 24, 1190 (1965)

- ESTABROOK, R.W., D.Y.COOPER and O.ROSENTHAL: The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C₂₁-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem.Zschr.* 338, 741 (1963)
- FOUTS, J.R. and L.A.ROGERS: Morphological changes in the liver accompanying stimulation of microsomal drug metabolizing enzyme activity by phenobarbital, chlor-dane, benzpyrene or methylcholanthrene in rats. *J.Pharmacol.Exper.Therap.* 147, 112 (1965)
- FUJITA, T., E.ITAGAKI and R.SATO: Purification and properties of cytochrome b1 from escherichia coli. *J.Biochem. (Tokyo)* 53, 282 (1963)
- FUJITA, T. and G.J.MANNERING: Differences in soluble P-450 hemoproteins from livers of rats treated with phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Chem.Biol.Interactions* 3, 264 (1971)
- GAYLOR, J.L., N.J.MOIR, H.E.SEIFRIED and C.R.E.JEFCOATE: Assay and isolation of a cyanid-binding protein of rat liver microsomes. *J.Biol.Chem.* 245, 5511 (1970)
- GELBOIN, H.V. and N.R.BLACKBURN: The stimulatory effect of 3-methylcholanthrene on benzpyrene hydroxylase activity in several rat tissues. Inhibition by actinomycin D and puromycin. *Cancer.Res.* 24, 356 (1964)
- GIGON, P.L. and M.BICKEL: Drug metabolism by hepatic microsomes from phenobarbital-treated or starved male and female rats in the presence of inhibitors. *Life Sci.* 10, 163 (1971)
- GIGON, P.L., T.E.GRAM and J.R.GILLETTE: Studies on the rate of reduction of hepatic microsomal P-450 by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: effect of drug substrates. *Molec.Pharmacol.* 5, 109 (1969)

- GILLETTE, J.R.: Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum. *Advances Pharmacol.* 4, 219 (1966)
- GILLETTE, J.R.: Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanisms. *Fortschr. Arzneimittelforsch.* 6, 11 (1963)
- GILLETTE, J.R.: Mechanisms of oxidation by enzymes in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* 16, 109 (1969)
- GILLETTE, J.R., B.B. BRODIE and B.N. LaDU: The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 119, 532 (1957)
- GILLETTE, J.R. and J.J. KAMM: The enzymatic formation of sulfoxides: the oxidation of chlorpromazine and 4,4'-diaminodiphenyl sulfide by guinea pig liver microsomes. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 130, 262 (1960)
- GLAUMANN, H.: Chemical and enzymatic composition of microsomal subfractions from rat liver after treatment with phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Chem. Biol. Interactions* 2, 369 (1970)
- GNOSSELIUS, Y., H. THOR and S. ORRENIUS: A comparative study of the effects of phenobarbital and 3,4-benzpyrene on the hydroxylating system of rat-liver microsomes. *Chem. Biol. Interactions* 1, 125 (1969/70)
- GREENE, F.E., B. STRIPP and J.R. GILLETTE: Effect of methylcholanthrene or phenobarbital pretreatment of rabbits and rats on the extinction coefficient for cytochrome P-450. *Pharmacology* 5, 43 (1971)
- GREIM, H., J.B. SCHENKMAN, M. KLOTZBÄCHER and H. REMMER: The influence of phenobarbital on the turnover of hepatic microsomal cytochrome b_5 and cytochrome P-450 hemes in the rat. *Biochim. biophys. Acta* 201, 20 (1970)

- HASHIMOTO, T., T. YAMANO and H. S. MASON: An electron spin resonance study of microsomal electron transport. *J. Biol. Chem.* 237, 3843 (1962)
- HAYAISHI, O., S. ROTHBERG and A. H. MEHLER: Studies on enzymatic oxygenation. 130th Am. Chem. Soc. Meeting (1956), p. 53
- HILDEBRANDT, A. and R. W. ESTABROOK: Evidence for the participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal mixed function oxidation reactions. *Archs Biochem. Biophys.* 143, 66 (1971)
- HILDEBRANDT, A. G., K. C. LEIBMAN and R. W. ESTABROOK: Metyrapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with phenobarbital. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 37, 477 (1969)
- HILDEBRANDT, A. G., H. REMMER and R. W. ESTABROOK: Cytochrome P-450 of liver microsomes - one pigment or many. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 30, 607 (1968)
- HILL, A. A. O., A. RÖDER and R. J. P. WILLIAMS: The chemical nature and reactivity of cytochrome P-450. *Structure and Bonding*, Springer Verlag 8, 123 (1970)
- ICHIKAWA, Y. and T. YAMANO: Electron spin resonance of microsomal cytochromes. Correlation of the amount of CO-binding species with so-called microsomal Fe_x in microsomes of normal tissues and liver microsomes of sudan III-treated animals. *Archs Biochem. Biophys.* 121, 742 (1967, a)
- ICHIKAWA, Y. and T. YAMANO: The role of the hydrophobic bonding in P-450 and the effect of organic compounds on the conversion of P-450 to P-420. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 147, 518 (1967, b)

- ICHIKAWA, Y. and T. YAMANO: The electron spin resonance and absorption spectra of microsomal cytochrome P-450 and its isocyanide complexes. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 153, 753 (1968)
- ICHIKAWA, Y., T. YAMANO and H. FUJISHIMA: Relationship between the interconversion of cytochrome P-450 and P-420 and its activities in hydroxylations and demethylations by P-450 oxidase systems. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 171, 32 (1969)
- IMAI, Y. and R. SATO: Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 22, 620 (1966, a)
- IMAI, Y. and R. SATO: Evidence for two forms of P-450 hemoprotein in microsomal membranes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 23, 5 (1966, b)
- IMAI, Y. and R. SATO: Activation and inhibition of microsomal hydroxylation by ethyl isocyanide. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 25, 1 (1966, c)
- IMAI, Y. and R. SATO: Conversion of P-450 to P-420 by neutral salts and other reagents. *Europ. J. Biochem.* 1, 419 (1967, a)
- IMAI, Y. and R. SATO: Anomalous spectral interactions of reduced P-450 with ethyl isocyanide and some other lipophilic ligands. *J. Biochem. (Tokyo)* 62, 464 (1967, b)
- IMAI, Y. and R. SATO: Behavior of two states of the ethyl isocyanide compound of reduced P-450 in oxidation-reduction cycle. *J. Biochem. (Tokyo)* 63, 370 (1968, a)
- IMAI, Y. and R. SATO: Dual effect of ethyl isocyanide on drug hydroxylation by liver microsomes. *J. Biochem. (Tokyo)* 63, 380 (1968, b)

- IMAI, Y. and P. SIEKEVITZ: A comparison of some properties of microsomal cytochrome P-450 from normal, methylcholanthrene-, and phenobarbital-treated rats. *Archs Biochem. Biophys.* 144, 143 (1971)
- JEFCOATE, C.R.E. and J.L. GAYLOR: Ligand interactions with cytochrome P-450. II. Influence of phenobarbital and methylcholanthrene induction processes on P-450 spectra. *Biochemistry* 8, 3464 (1969)
- JEFCOATE, C.R.E., J.L. GAYLOR and R.L. CALABRESE: Ligand interactions with cytochrome P-450. I. Binding of primary amines. *Biochemistry* 8, 3455 (1969)
- JICK, H. and L. SHUSTER: The turnover of microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome c reductase in the liver of mice treated with phenobarbital. *J. Biol. Chem.* 241, 5366 (1966)
- KAHL, G.F.: Experiments on the metyrapone reducing microsomal enzyme system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.* 266, 61 (1970, a)
- KAHL, G.F.: Untersuchungen zu Stoffwechsel und Wirkung von Metyrapon in der Leberzelle. *Habilitationsschrift*, Mainz (1970, b)
- KAHL, G.F. and K.J. NETTER: The effect of metyrapone on cellular respiration and microsomal drug oxydation. *Biochem. Pharmacol.* 19, 27 (1970)
- KAHL, G.F. and S. SIMON: Action of metyrapone on the redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide and on oxygen consumption of perfused rat livers and isolated mitochondria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.* 268, 1 (1971)
- KAMIN, H. and B.S.S. MASTERS: In: "Enzymatic oxidations of toxicants" (E. HODGSON, ed.), p. 9. North Carolina State Univ., Raleigh (1968)

- KAMIN, H., B.S.S. MASTERS, Q.H. GIBSON and C.H. WILLIAMS: Microsomal TPNH-cytochrome c reductase. *Fed. Proc.* 24, 1164 (1965)
- KINOSHITA, T. and S. HORIE: Studies on P-450. III. On the absorption spectrum of P₄₅₀ in rabbit liver microsomes. *J. Biochem. (Tokyo)* 61, 26 (1967)
- KLINGENDERGER, M.: Pigments of rat liver microsomes. *Archs Biochem. Biophys.* 75, 376 (1958)
- KRATZ, F. and H. STAUDINGER: Änderungen von Kaninchenlebermikrosomen durch Cumarin. *Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem.* 349, 455 (1968)
- KRAULIS, I. and M.K. BIRMINGHAM: Hydroxylation sequences in rat adrenal steroids and effects of Su 4885 on C₁₈-oxygenation. *Fed. Proc.* 22, 530 (1963)
- KRAULIS, I., H. TRAIKOV, M.P. LI, C.P. JANTOS and M.K. BIRMINGHAM: The reduction of Su-4885 by adrenal glands and other tissues and its inhibition by ACTH. *Canad. J. Biochem.* 46, 463 (1968)
- KRÖBER, F., G. LANGE, S. MATHES und G. NOR: Qualitative Änderungen in Lebermikrosomen Phenobarbital-behandelter Kaninchen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 267, 307 (1970)
- KURIYAMA, Y., T. OMURA, P. SIEKEVITZ and G.E. PALADE: Effects of phenobarbital on the synthesis and degradation of the protein components of rat liver microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 244, 2017 (1969)
- LaDU, B.N., L. GAUDETTE, N. TROUSOF and B.B. BRODIE: Enzymatic dealkylation of aminopyrine (pyramidon) and other alkylamines. *J. Biol. Chem.* 214, 741 (1955)

- LANGE, G.: Hydroxylase-Aktivität und Hämoprotein-Gehalt von Mikrosomen aus Kaninchenleber. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 259, 221 (1968)
- LEIBMAN, K.C.: Effects of metyrapone on liver microsomal drug oxidations. Molec.Pharmacol. 5, 1 (1969)
- LEIBMAN, K.C. and R.W.ESTABROOK: Effects of extraction with isooctane upon the properties of liver microsomes. Molec.Pharmacol. 7, 26 (1971)
- LEIBMAN, K.C., A.G.HILDEBRANDT and R.W.ESTABROOK: Spectrophotometric studies of interactions between various substrates in their binding to microsomal cytochrome P-450. Biochem.biophys.Res.Comm. 36, 789 (1969)
- LEVIN, W. and R.KUNTZMAN: Biphasic decrease of radioactive hemoprotein from liver microsomal carbon monoxide-binding particles: effect of phenobarbitale and chlordan. Molec.Pharmacol. 5, 499 (1969)
- LEYBOLD, K. und HJ.STAUDINGER: Geschlechtsunterschiede im Steroidstoffwechsel von Rattenlebermikrosomen. Biochem.Zschr. 331, 389 (1959)
- LIDDLE, G.W., D.ISLAND, E.M.LANCE and A.P.HARRIS: Alterations of adrenal steroid patterns in man resulting from treatment with a chemical inhibitor of 11 β -hydroxylation. J.clin.Endocr. 18, 906 (1958)
- LIDDLE, G.W., D.ISLAND, C.K.MEADOR: Normal and abnormal regulation of corticotropin secretion in man. Recent Progr.Hormone Res. 18, 125 (1962)
- LIER, A.: Inauguraldissertation, 1972
- LOWRY, O.H., N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR and R.J.RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)

- LU, A.Y.H., R.KUNTZMAN, S.WEST and A.H.CONNEY: Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds and endogenous substrates. I. Determination of substrate specificity by the cytochrome P-450 and P-448 fractions. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 42, 6 (1971)
- MADIX, J.C. and E.BRESNICK: Increased efficacy of liver chromatin as a template for RNA synthesis after administration of 3-methylcholanthrene. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 28, 445 (1967)
- MANNERING, G.J.: Properties of cytochrome P-450 as affected by environmental factors: qualitative changes due to administration of polycyclic hydrocarbons. *Metabolism* 20, 2 (1971, a)
- MANNERING, G.J.: Inhibition of drug metabolism, in: *Concepts in Biochemical Pharmacology* ed. B.B.BRODIE, J.R. GILLETTE, *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, New York: Springer Verlag XXVIII/2, pg.452 (1971, b)
- MANNERING, G.J., A.C.DIXON, E.M.BAKER and T.ASAMI: The in vivo liberation of morphine from codeine in man. *J.Pharmacol.Exper.Therap.* 111, 142 (1954)
- MASON, H.S.: Mechanism of oxygen metabolism. *Advances Enzymol.* 19, 79 (1957)
- MASON, H.S., J.-C.NORTH and M.VANNESTE: Microsomal mixed-function oxidations: the metabolism of xenobiotics. *Fed.Proc.* 24, 1172 (1965)
- MAYER, G., V.ULLRICH and HJ.STAUDINGER: Possible involvement of cytochrome b_5 in L-Kynurenine-3-hydroxylase of rat liver mitochondria. *Hoppe-Seyler's Zschr. physiol.Chem.* 349, 459 (1968)

- MITANI, F., A.P. ALVARES, S. SASSA and A. KAPPAS: Preparation and properties of a solubilized form of cytochrome P-450 from chick embryo liver microsomes. *Molec. Pharmacol.* 7, 280 (1971)
- MITOMA, C., H.S. POSNER, H.C. REITZ and S. UDENFRIEND: Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Archs Biochem. Biophys.* 61, 431 (1956)
- MITOMA, C. and S. UDENFRIEND: Enzymatic hydroxylation of aromatic drugs. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 113, 40 (1955)
- MIYAKE, Y., J.L. GAYLOR and H.S. MASON: Properties of a submicrosomal particle containing P-450 and flavo-protein. *J. Biol. Chem.* 243, 5788 (1968)
- NETTER, K.J.: Eine Methode zur direkten Messung der O-Demethylierung und ihre Anwendung auf die Mikrosomenhemmwirkung von SKF 525-A. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* 238, 292 (1960)
- NETTER, K.J.: Die oxydative N-Demethylierung von N-Monomethyl-p-Nitranilin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* 255, 151 (1966)
- NETTER, K.J., S. JENNER und K. KAJUSCHKE: Über die Wirkung von Metyrapon auf den mikrosomalen Arzneimittelabbau. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* 259, 1 (1967)
- NETTER, K.J., G.F. KAHL and M.P. MAGNUSSEN: Kinetic experiments on the binding of metyrapone to liver microsomes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.* 265, 205 (1969)
- NETTER, K.J. and G. SEIDEL: An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 146, 61 (1964)

- OMURA, T.: cited in: "Microsomes and drug oxidations" (J.R. GILLETTE, A.H. CONNEY, G.J. COSMIDES, R.W. ESTABROOK, J.R. FOUTS and G.J. MANNERING, eds.) p.160/161. Academic press, New York (1969)
- OMURA, T. and R. SATO: A new cytochrome in liver microsomes. J.Biol.Chem. 237, 1375 (1962)
- OMURA, T. and R. SATO: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J.Biol.Chem. 239, 2370 (1964, a)
- OMURA, T. and R. SATO: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. J.Biol.Chem. 239, 2379 (1964, b)
- OMURA, T. and R. SATO: Symposium on oxidative enzymes. Proc.Intern.Congr.Biochem., 6th, New York 32, 298 (1964, c)
- OMURA, T., R. SATO, D.Y. COOPER, O. ROSENTHAL and R.W. ESTABROOK: Function of cytochrome P-450 of microsomes. Fed. Proc. 24, 1181 (1965)
- ORRENIUS, S.: Further studies on the induction of the drug-hydroxylating enzyme system of liver microsomes. J.cell.Biol. 26, 725 (1965)
- ORRENIUS, S., G. DALLNER and L. ERNSTER: Inhibition of the TPNH-linked lipid peroxidation of liver microsomes by drugs undergoing oxidative demethylation. Biochem.biophys.Res.Commun. 14, 329 (1964)
- ORRENIUS, S., J.L.E. ERICSSON and L. ERNSTER: Phenobarbital-induced synthesis of the microsomal drug-metabolizing enzyme system and its relationship to the proliferation of endoplasmic membranes. A morphological and biochemical study. J.cell.Biol. 25, 627 (1965)

- ORRENTUS, S. and L.ERNSTER: Phenobarbital-induced synthesis of the oxidative demethylating enzymes of rat liver microsomes. *Biochem.biophys.Res.Comm.* 16, 60 (1964)
- OSHINO, N., Y.IMAI and R.SATO: Electron-transfer mechanism associated with fatty acid desaturation catalyzed by liver microsomes. *Biochim.biophys.Acta* 128, 13 (1966)
- PALADE, G.F.: Electron microscopy of mitochondria and other cytoplasmic structures. In: GAEBLER, O.H.; (Ed.): *Enzymes, units of biological structure and function.* Academic Press, New York 1956, p.185
- PECHTHOLD, F.: Zur Kenntnis des Abbaues von Dimethylamino-phenyldimethylpyrazolon im Organismus. *Arzneimittel-Forsch., Aulendorf* 14, 972 (1964)
- PEISACH, J. and W.E.BLUMBERG: EPR-study of the high- and low-spin forms of cytochrome P-450 in liver microsomes from a methylcholanthrene-treated rabbit. *Proc.nat. Acad.Sci.* 67, 172 (1970)
- PETERSON, J.A.: Camphor binding by pseudomonas putida cytochrome P-450. *Archs Biochem.Biophys.* 144, 678 (1971)
- PHILLIPS, A.H. and R.G.LANGDON: Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. *J.Biol.Chem.* 237, 2652 (1962)
- PHILPOT, R.M. and E.HODGSON: A cytochrome P-450-peperonyl butoxide spectrum similar to that produced by ethyl isocyanide. *Life Sci.* 10, 503 (1971)
- POSNER, H.S., C.MITOMA, S.ROTHBERG and S.UDENFRIEND: Enzymic hydroxylation of aromatic compounds.III.Studies on the mechanism of microsomal hydroxylation. *Archs Biochem.Biophys.* 94, 280 (1961)

- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 235, 279 (1959)
- REMMER, H.: The induction of hydroxylating by drugs. FEBS Letters 16, 125 (1969)
- REMMER, H. and H.J.MERKER: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal). Klin.Wschr. 41, 276 (1963)
- REMMER, H. and H.J.MERKER: Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes. Ann.N.Y.Acad.Sc. 123, 79 (1965)
- REMMER, H., J. .SCHENKMAN, R.W.ESTABROOK, H.SASAME, J.GILLETTE, D.Y.COOPER, S.NARASIMHULU and O.ROSENTHAL: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Molec.Pharmacol. 2, 187 (1966)
- REMMER, H., J.B.SCHENKMAN and H.GREIM: Spectral investigations on cytochrome P-450. In: GILLETTE, J.R., A.H. CONNEY, G.J.COSMIDES, R.W.ESTABROOK, J.R.FOUTS and G.J. MANNERING; (Eds.): Microsomes and drug oxidations. Academic Press, New York, London (1969), p.371
- RUBIN, A., T.R.TEPHLY and G.J.MANNERING: Kinetics of drug metabolism by hepatic microsomes. Biochem. Pharmacol. 13, 1007 (1964)
- SANZARI, N.P. and F.G.PERON: Influence of metopirone on substrate-supported hydroxylation of DOC by rat adrenal mitochondria. Steroids 8, 929 (1966)
- SASAME, H.A. and J.R.GILLETTE: Studies on the relationship between the effects of various substances on absorption spectrum of cytochrome P-450 and the reduction of p-nitrobenzoate by mouse liver microsomes. Molec.Pharmacol. 5, 123 (1969)

- SASAME, H.A. and J.R. GILLETTE: Studies on the inhibitory effects of various substances on drug metabolism by liver microsomes: the effect of nicotinamide in altering the apparent mechanism of inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 19, 1025 (1970)
- SCHENKMAN, J.B.: Studies on the nature of the type I and type II spectral changes in liver microsomes. *Biochemistry* 9, 2081 (1970)
- SCHENKMAN, J.B., H. REMMER and R.W. ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molec. Pharmacol.* 3, 113 (1967, a)
- SCHENKMAN, J.B., I. FREY, H. REMMER and R.W. ESTABROOK: Sex differences in drug metabolism by rat liver microsomes. *Molec. Pharmacol.* 3, 516 (1967, b)
- SCHENKMAN, J.B., H. GREIM, M. ZANGE and H. REMMER: On the problem of possible other forms of cytochrome P-450. *Biochim. biophys. Acta* 171, 23 (1969)
- SCHENKMAN, J.B. and R. SATO: The relationship between the pH-induced spectral change of the hepatic microsomal mixed-function oxidase. *Molec. Pharmacol.* 4, 613 (1968)
- SHOEMAN, D.W., M.D. CHAPLIN and G.J. MANNERING: Induction of drug metabolism. III. Further evidence for the formation of a new P-450 hemoprotein after treatment of rats with 3-methylcholanthrene. *Molec. Pharmacol.* 5, 412 (1969)
- SHUSTER, L. and H. JICK: The turnover of microsomal protein in the livers of phenobarbital-treated mice. *J. Biol. Chem.* 241, 5361 (1966)
- SIES, H. and B. BRAUSER: Interaction of mixed function oxidase with its substrates and associated redox transitions of cytochrome P-450 and pyridine nucleotides in perfused rat liver. *Europ. J. Biochem.* 15, 531 (1970)

SLADEK, N.E. and G.J.MANNERING: Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene-treated rats. *Biochem.biophys.Res. Commun.* 24, 668 (1966,a)

SLADEK, N.E. and G.J.MANNERING: Comparison of phenobarbital (PB) and methylcholanthrene (MC) induction of microsomal enzyme systems which N-demethylate ethylmorphine (EM) and 3-methyl-4-monomethylaminoazobenzene (3-CH₃-MAB). *Fed.Proc.* 25, 418 (1966,b)

SLADEK, N.E. and G.J.MANNERING: Induction of drug metabolism. I. Differences in the mechanisms by which polycyclic hydrocarbons and phenobarbital produce their inductive effects on microsomal N-demethylating systems. *Molec.Pharmacol.* 5, 174 (1969)

SPRUNT, J.G., M.C.K.BROWNING and D.M.HANNAH: Some aspects of the pharmacology of metyrapone. *Mem.Soc.Endocrinol.* 17, 193 (1967)

STRITTMATTER, C.F. and E.G.BAILL: The intracellular distribution of cytochrome components and of oxidative enzyme activity in rat liver. *J.Cellul.Comp.Physiol.* 43, 57 (1954)

STRITTMATTER, P.: The interaction of nucleotides with microsomal cytochrome reductase. *J.Biol.Chem.* 233, 748 (1958)

UEHLEKE, H., U.BREYER, B.BUDCZIES, S.TABARELLI und K.H.HELLMER: Der Einfluß von Metyrapon auf verschiedene Typen von mikrosomalen N-Oxidationen. *Hoppe-Seyler's Zschr. physiol.Chem.* 352, 403 (1971)

UEHLEKE, H. and K.H.HELLMER: Competitive inhibition of the microsomal N-hydroxylation of 4-chloroaniline by metyrapone and cyclohexane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.* 268, 242 (1971)

- ULLRICH,V.: On the hydroxylation of cyclohexane in rat liver microsomes. Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 350, 357 (1969)
- WADA,F.,H.SHIBATA,M.GOTO and Y.SAKAMOTO: Participation of the microsomal electron transport system involving cytochrome P-450 in -oxidation of fatty acids. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 162, 518 (1968)
- WATERMAN,M.R. and H.S.MASON: The redox potential of liver cytochrome P-450. Biochem.biophys.Res.Comm. 39, 451 (1970)
- WILLIAMS,C.H.,Jr. and H.KAMIN: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. J.Biol.Chem. 237, 587 (1962)
- WILLIAMS,R.J.P.: In: Conference on cytochromes,p.393; ed.M.KAMEN and K.OKUNUKI.Tokyo:University Press 1967
- YONG,F.C.,T.E.KING,S.OLDHAM,M.R.WATERMAN and H.S.MASON: Redox-dependent conformational changes of rabbit liver cytochrome P-450. Archs Biochem.Biophys. 138, 96 (1970)

LEBENS LAUF

Am 16. August 1945 wurde ich als dritter Sohn des Verwaltungsangestellten Wilhelm Jönen und dessen Ehefrau Johanna, geborene Ludwig, in Hamburg geboren. Nach Einschulung im Frühjahr 1952 besuchte ich vier Jahre lang die Grundschule und neun weitere Jahre das Humanistische Gymnasium in Hamburg.

Nach der Reifeprüfung am 23. Februar 1965 leistete ich einen verkürzten Grundwehrdienst von einem Jahr in Hamburg und Itzehoe ab.

Nach einsemestrigem Studium der Naturwissenschaften erhielt ich die Zulassung für das Medizinstudium. Dieses nahm ich im Wintersemester 1966/67 an der Universität Hamburg auf. Ab Wintersemester 1969/70 setzte ich das Studium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz fort und beendete dort am 7. Juli 1972 die ärztliche Prüfung. Seit dem 1. August 1972 bin ich an der Universitätsklinik Mainz als Medizinalassistent tätig. Die Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit begann ich im Mai 1970 am Pharmakologischen Institut der Universität, Mainz.

